

MARIA TEREZA SANTOS SERIKAWA MORI

**APLICAÇÃO DE NISINA EM ENVOLTÓRIO CELULÓSICO PARA  
MORTADELA**

SÃO CAETANO DO SUL

2013

MARIA TEREZA SANTOS SERIKAWA MORI

**APLICAÇÃO DE NISINA EM ENVOLTÓRIO CELULÓSICO PARA  
MORTADELA**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Linha de pesquisa: Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cynthia Jurkiewicz Kunigk

SÃO CAETANO DO SUL

2013

Mori, Maria Tereza Santos Serikawa

Aplicação de nisina em envoltório celulósico para mortadela / Maria Tereza Santos Serikawa Mori – São Caetano do Sul, SP: CEUN-EEM, 2013.

83p.

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação. Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos – Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP, 2013.

Orientadora: Profª. Drª. Cynthia Jurkiewicz Kunigk

1. Nisina 2. Envoltório de celulose 3. Mortadela 4. Bactérias láticas I. Mori, Maria Tereza Santos Serikawa II. Instituto Mauá de Tecnologia. Centro Universitário III. Título

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu querido pai Adelino (*in memoriam*) e à minha amada mãe Célia por uma vida repleta de aprendizado.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Cynthia Jurkiewicz Kunigk por toda orientação, direcionamento, apoio e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho. Espero que este trabalho enalteça a competente profissional com quem tive o privilégio de trabalhar.

Aos técnicos e colaboradores da Faculdade Mauá, Douglas, Edna, Inês, Sandra pela ajuda nos testes e, em especial, à Ana Paula pelo grande apoio e esforço em atender às minhas solicitações.

À Marba Ltda por permitir a utilização de suas instalações e recursos. Em especial a todos aos que direta ou indiretamente colaboraram com muita disposição para o desenvolvimento deste trabalho, Edson, Cirso, Juliana, Cidália, Josefa, Vanderli, Camila, Ismael, Viviane, José Valdo, Mariana, Valéria, Roberto, Júlia e Ademilson.

À toda a minha família, em especial meu esposo Fábio, minha filha Lynda Keiko, meus irmãos Vívian e Leonardo por compreenderem os momentos em que precisei me ausentar para cumprir com minhas obrigações.

Às minhas queridas amigas que estão comigo em todos os momentos e me ajudam a superar as dificuldades, Cristina Nascimento, Mariana Fasanella, Silvia e Helen.

Acima de tudo, agradeço a Deus que manteve o meu ânimo mesmo diante dos maiores obstáculos.

## RESUMO

Os produtos embutidos como a mortadela, são amplamente consumidos pela população brasileira, mas apresentam uma limitada vida útil quando comparada a produtos do mesmo gênero. Na busca por uma alternativa ao aumento da vida-de-prateleira, as bacteriocinas surgem como uma importante opção para substituição de alguns aditivos, sem alteração das características sensoriais. Entre as bacteriocinas, a nisina já possui aprovação para uso pela FAO (Food and Agriculture Organization) e WHO (World Health Organization) desde 1969 e seu emprego direto no alimento ou indiretamente nas embalagens, tem demonstrado eficiência no controle da multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Procurando contribuir com a pesquisa de novas aplicações para a nisina em embalagens, este trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência da nisina, quando aplicada em envoltório celulósico de mortadela, no controle da multiplicação de bactérias mesófilas aeróbias e bactérias láticas (BAL). A influência de diferentes fatores na atividade antimicrobiana do envoltório celulósico hidratado em solução de nisina foi avaliada pelo teste de difusão em ágar. Os fatores avaliados foram, o tipo de diluente da nisina, pH e concentração da solução de nisina, tempo e temperatura de hidratação. O envoltório celulósico com nisina incorporada também foi adicionado em mortadela e o desenvolvimento de bactérias deteriorantes foi avaliado durante o armazenamento do produto. Os resultados demonstraram que o envoltório hidratado em solução de diluente tampão fosfato de potássio pH 6,0 combinado com 1 g/L de nisina, na temperatura de 40 °C por 12 horas apresentou a maior atividade antimicrobiana. A aplicação em mortadela do envoltório celulósico hidratado em solução de tampão fosfato pH 6,0 e 1 g/L de nisina, reduziu entre 2,0 e 3,5 Log (UFC/g) nas populações de bactérias mesófilas aeróbias e BAL comparado às contagens determinadas no tratamento controle (sem nisina) ao longo da vida-de-prateleira do produto. A solução de hidratação de nisina e ácido fosfórico 0,1% foi incapaz de reduzir as contagens de bactérias, não apresentando diferença significativa em relação ao tratamento controle.

**PALAVRAS-CHAVE: NISINA. ENVOLTÓRIO DE CELULOSE. MORTADELA. BACTÉRIAS LÁTICAS.**

## ABSTRACT

The meat-based products such as bologna are widely consumed by Brazilian population, although it has a limited shelf life, when compared to similar products. As an alternative to increase the shelf life, bacteriocins have emerged as an important option to replace some additives without changing the sensory characteristics. Among bacteriocins, nisin has been approved to be used by FAO (Food and Agriculture Organization) and WHO (World Health Organization) since 1969 and its direct application on food or indirectly on packaging have demonstrated efficiency to control the multiplication of pathogen and spoilage bacteria. Aiming to contribute with the research of new applications for nisin on packaging, this study evaluated the antimicrobial activity of nisin, when applied in a cellulose casing of bologna to control the growth of mesophilic aerobic and lactic acid bacteria (LAB). The influence of different factors in the antimicrobial activity of the cellulose casing incorporated with nisin was evaluated by the agar diffusion test. The factors evaluated were the type of solvent, pH and concentration of nisin in the solution, time and temperature of soaking solution. The cellulose casing incorporated with nisin was also added in the bologna and the growth of spoilage bacteria was evaluated during the product storage. Results demonstrated that the cellulose casing hydrated in the solution potassium phosphate buffer pH 6.0 in combination with nisin, at 40 °C for 12 hours presented the highest antimicrobial activity. The application in bologna of cellulose casing hydrated in solution potassium phosphate buffer pH 6.0 and 1g/L of nisin, reduced between 2.0 to 3.5 Log (CFU/g) the populations of mesophilic aerobic and LAB, compared to the counts assessed for control treatment (without nisin) during the product shelf life. The hydrated solution of nisin and phosphoric acid 0.1% was unable to reduce the bacteria population, and did not show statistical difference in comparison to control treatment.

**Keywords:** NISIN. CELLULOSE CASING. BOLOGNA. LACTIC ACID BACTERIA.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de pH e concentração dos diluentes utilizados no preparo da solução de Nisaplin® .....	36
Tabela 2 - Tratamentos com três réplicas da mortadela considerando os fatores concentração de Nisaplin® e concentração de CMS .....	38
Tabela 3 - Formulações das Mortadelas .....	39
Tabela 4 - Níveis dos fatores tipo de diluente e tempo de hidratação .....	41
Tabela 5 – Resultados obtidos a partir dos testes de difusão em ágar para avaliação do efeito inibitório do envoltório (testado em duplicata) hidratado em soluções de ácido fosfórico 0,1% e adicionados de Nisaplin® a 600 ou 1000 mg/L.....	45
Tabela 6 – Resultados obtidos a partir do teste de difusão em ágar do envoltório hidratado e solução de hidratação (com e sem nisina) mantidos a 40 °C em diferentes tempos e diluentes .....	47
Tabela 7 – Resultados obtidos a partir do teste de difusão em ágar do envoltório hidratado e solução de hidratação (com e sem nisina) mantidos em diferentes temperaturas por 12 horas .....	50
Tabela 8 – Resultados obtidos a partir do teste de difusão em ágar de tripa suína hidratada (com nisina), envoltório hidratado (com nisina) e solução de hidratação (com e sem nisina) considerando diferentes diluentes e pH.....	52
Tabela 9 – Resultado obtido para a determinação da atividade antimicrobiana (UA/mL) da solução de Nisaplin® (1000 mg/L) em tampão fosfato com diferentes valores de pH e da mesma solução após a hidratação do envoltório celulósico e da tripa natural suína .....	54
Tabela 10 – Resultados físico-químicos (média e desvio padrão de três lotes) das amostras de mortadela A (15% de CMS) e B (10% de CMS) com 1 dia de armazenamento .....	55
Tabela 11 - Contagem total de bactérias mesófilas aeróbias (média e desvio padrão de três lotes) em amostras retiradas do centro da peça de mortadela, produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto).....	56
Tabela 12 - Contagem total de bactérias mesófilas aeróbias (média e desvio padrão de três lotes) em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela, produzidas de acordo com os	

diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto) .....	56
Tabela 13 - Contagem de bactérias láticas (média e desvio padrão de três lotes) em amostras retiradas do centro da peça de mortadela, produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto) .....	57
Tabela 14 - Contagem de bactérias láticas (média e desvio padrão de três lotes) em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela, produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto) .....	57
Tabela 15 - Análise de variância para a contagem de bactérias mesófilas aeróbias na mortadela....	58
Tabela 16 - Análise de variância para a contagem de bactérias láticas na mortadela .....	60
Tabela 17 – Resultados físico-químicos da mortadela, 1 dia após sua produção (média e desvio padrão de três lotes avaliados) .....	63
Tabela 18 - Contagem total de bactérias mesófilas aeróbias e bactérias láticas (média e desvio padrão de três réplicas), obtidas a partir de amostras coletadas da superfície de mortadela embutida em envoltório celulósico, hidratado com solução tampão fosfato pH 6,0 (com e sem nisina) .....	63
Tabela 19 – Análise de Variância (ANOVA) para a contagem de bactérias mesófilas aeróbias na mortadela .....	64
Tabela 20 –Análise de Variância (ANOVA) para a contagem de bactérias láticas na mortadela ....	64
Tabela 21 - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras retiradas do centro da peça de mortadela (Lote 1), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto) 77	77
Tabela 22 - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela (Lote 1), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto) 77	77
Tabela 23 - Contagem de bactérias láticas em amostras retiradas do centro da peça de mortadela (Lote 1), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto) ....	78

Tabela 24 - Contagem de bactérias láticas em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela (Lote 1), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto) 78	
Tabela 25 - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras retiradas do centro da peça de mortadela (Lote 2), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto) 79	
Tabela 26 - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela (Lote 2), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto) 79	
Tabela 27 - Contagem de bactérias láticas em amostras retiradas do centro da peça de mortadela (Lote 2), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)..... 80	
Tabela 28 - Contagem de bactérias láticas em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela (Lote 2), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto) 80	
Tabela 29 - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras retiradas do centro da peça de mortadela (Lote 3), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto) 81	
Tabela 30 - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela (Lote 3), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto) 81	
Tabela 31 - Contagem de bactérias láticas em amostras retiradas do centro da peça de mortadela (Lote 3), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)..... 82	
Tabela 32 - Contagem de bactérias láticas em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela (Lote 3), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto) 82	
Tabela 33 - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras mortadela (Lote 1), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos ..... 83	
Tabela 34 - Contagem de bactérias láticas em amostras mortadela (Lote 1), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos ..... 83	

Tabela 35 - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras mortadela (Lote 2), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos .....	83
Tabela 36 - Contagem de bactérias láticas em amostras mortadela (Lote 2), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos .....	84
Tabela 37 - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras mortadela (Lote 3), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos .....	84
Tabela 38 - Contagem de bactérias láticas em amostras mortadela (Lote 3), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos .....	84

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama de fabricação de mortadela .....	21
Figura 2 - Estrutura primária da nisina (PARADA, 2007).....	26
Figura 3 - Esquema de tratamentos das mortadelas A e B considerando os fatores concentração de Nisaplin® e concentração de CMS.....	38
Figura 4 – Teste de difusão em ágar de envoltórios (E), testados em duplicata, hidratados em solução de ácido fosfórico 0,1% e Nisaplin® a 600 mg/L e 1000 mg/L e poço (N) contendo a solução de hidratação com nisina. ....	46
Figura 5 - Teste de difusão em ágar de envoltórios (E), testado em duplicata, hidratados em solução de Nisaplin® 1000 mg/L em ácido fosfórico 0,1% e em solução tampão fosfato de potássio pH 6,0, por 40 minutos 40°C. Poço (N) contendo as mesmas soluções de hidratação com nisina.....	48
Figura 6 - Teste de difusão em ágar de envoltórios (E), testados em duplicata, hidratados em solução tampão de fosfato de potássio pH 6,0 e 1000 mg/L Nisaplin® (temperatura de hidratação 25, 40 °C/12 horas). Poço (N) contendo a mesma solução de hidratação com nisina. ....	50
Figura 7 - Teste de difusão em ágar de envoltórios celulósicos (E) e tripas natural suína (S) hidratados (testados em duplicata) em solução de Nisaplin® (1000 mg/L) e tampão pH 2,5; 3,5 ou ácido fosfórico 0,1%. Poços contendo as soluções de hidratação (N) com e (C) sem nisina.....	52
Figura 8 - Teste de difusão em ágar de envoltórios celulósicos (a) e tripas natural suína (b) hidratados (testados em duplicata) em solução de Nisaplin® (1000 mg/L) e tampão pH 4,5; 6,5 ou em água destilada. Poços contendo as soluções de hidratação (E) com nisina e (C) sem nisina.....	53
Figura 9 - Teste de difusão em ágar de envoltório celulósico (E) e tripas natural suína (S) hidratados (testados em duplicata) em solução de Nisaplin® (1000 mg/L) e tampão fosfato de potássio pH 7,0;8,0 ou 9,0. Poços contendo as soluções de hidratação (N) com nisina e (C) sem nisina. ....	53

Figura 10 - Contagem de bactérias mesófilas aeróbias log UFC/g na mortadela, média de três réplicas, em função do tempo de armazenamento (dias) e amostragem (Centro, C e Superfície, S).....	59
Figura 11 - Interação entre concentração de CMS e tempo de armazenamento para a contagem de bactérias láticas nos três lotes de mortadela avaliados.....	61
Figura 12 - Interação entre amostragem e tempo de armazenamento para a contagem de BAL nos três lotes de mortadela avaliados (C: centro; S: superfície).....	62
Figura 13 - Contagem total de bactérias mesófilas aeróbias em superfície de mortadela embutida em envoltório de celulose hidratado com solução de Nisaplin® (1000 mg/L) em tampão fosfato pH 6,0 e no controle (sem Nisaplin®).....	65
Figura 14 - Contagem de bactérias láticas em superfície de mortadela embutida em envoltório de celulose hidratado com solução de Nisaplin® (1000 mg/L) em tampão fosfato pH 6,0 e no controle (sem Nisaplin®).....	66

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1	MORTADELA .....	19
2.2	DETERIORAÇÃO DE MORTADELA .....	22
2.3	BACTERIOCINAS .....	23
2.4	NISINA .....	25
2.5	APLICAÇÃO DE NISINA EM PRODUTOS CÁRNEOS .....	28
2.6	COMBINAÇÃO DE NISINA E OUTROS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS .....	29
2.7	APLICAÇÃO DE NISINA EM EMBALAGENS .....	31
3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
3.1	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ENVOLTÓRIO CELULÓSICO HIDRATADO EM SOLUÇÃO DE NISINA .....	34
3.1.1.	Teste de difusão em ágar .....	36
3.1.2.	Avaliação da atividade antimicrobiana remanescente na solução de hidratação .....	37
3.2	ESTUDO DA VIDA-DE-PRATELEIRA DE MORTADELA UTILIZANDO ENVOLTÓRIO CELULÓSICO HIDRATADO EM SOLUÇÃO DE NISAPLIN® .....	37
3.2.1.	Atividade antimicrobiana do envoltório celulósico, hidratado em solução de Nisaplin® em ácido fosfórico 0,1%, aplicado à mortadela .....	37
3.2.1.1	Formulação e processamento da mortadela .....	38
3.2.2.	Avaliação da atividade antimicrobiana do envoltório celulósico, hidratado em solução de Nisaplin® em tampão fosfato pH 6,0, aplicado à mortadela .....	40
3.3	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
3.4	Análises Microbiológicas .....	42
3.4.1	Contagem de bactérias mesófilas aeróbias .....	42
3.4.2	Contagem de bactérias láticas .....	42
3.5	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	43
3.5.1	Determinação de umidade (Método Gravimétrico Estufa) .....	43
3.5.2	Determinação de proteína (Método Micro-Kjeldahl – Nx6,25) .....	43
3.5.3	Determinação de gordura (Extração com solvente orgânico) .....	43

3.5.4	Determinação de cinzas .....	44
3.5.5	Determinação de carboidratos .....	44
3.5.6	Determinação de pH .....	44
3.5.7	Determinação de atividade de água (aw).....	44
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
4.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NISINA INCORPORADA AO ENVOLTÓRIO.....	45
4.1.1	Avaliação do efeito da concentração de Nisaplin®.....	45
4.1.2	Avaliação do efeito do tipo de diluente e tempo de hidratação.....	46
4.1.3	Avaliação do efeito da temperatura de hidratação.....	48
4.1.4	Avaliação da atividade antimicrobiana em diferentes valores de pH.....	50
4.1.5	Avaliação da atividade antimicrobiana remanescente na solução de hidratação .....	53
4.2	AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ENVOLTÓRIO CELULÓSICO HIDRATADO EM SOLUÇÃO DE NISAPLIN® EM ÁCIDO FOSFÓRICO 0,1%, APLICADO À MORTADELA. ....	54
4.2.1	Resultados físico-químicos.....	54
4.2.2	Resultados microbiológicos ao longo da vida-de-prateleira do produto .....	55
4.3	AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ENVOLTÓRIO CELULÓSICO DO PRODUTO HIDRATADO EM SOLUÇÃO DE NISAPLIN® E TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO PH 6,0, APLICADO À MORTADELA.....	62
4.3.1	Resultados físico-químicos da mortadela .....	62
4.3.2	Resultados microbiológicos ao longo da vida-de-prateleira da mortadela.....	63
5.	CONCLUSÕES .....	67
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
	ANEXO A .....	77
	ANEXO B .....	83

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos industrializados, cada vez mais consumidos pela população (IBGE, 2010) compõem atualmente um segmento de mercado altamente competitivo, tanto em diversidade, quanto em valor comercial.

Os derivados cárneos industrializados foram, por muitos anos, uma alternativa de elevada rentabilidade para os frigoríficos, posicionando um produto de alto valor agregado e atendendo ao requisito de praticidade. Entretanto, com o aumento da competitividade direta (crescimento do número de concorrentes fabricando os mesmos itens) e indireta (substituição por itens de outras categorias), a busca das companhias pela permanência no mercado, na maioria das vezes com foco na redução de despesas e custos, tornou-se um fator limitante para a qualidade de tais produtos.

Neste novo cenário, o aumento da vida-de-prateleira de qualquer produto é essencialmente relevante para a rentabilidade das companhias, garantindo que as operações logísticas (armazenamento e transporte) ocorram de forma a permitir o posicionamento em mercados cada vez mais distantes, possibilitando maior tempo de exposição nos pontos-de-venda, diminuindo os custos de descarte e reposição, além de já ser um diferencial competitivo reconhecido pelo público consumidor, que deseja na maioria das vezes, adquirir um produto antes da sua validade e mantê-lo armazenado, consumindo em outros momentos e não apenas no ato da compra.

Os consumidores, cada vez mais exigentes quanto à qualidade, também esperam que as características iniciais do produto, não apenas do ponto de vista de segurança alimentar, mas também sensoriais, sejam preservadas durante todo o período entre a aquisição e o consumo. Considerando este aspecto, a indústria enfrenta o desafio de manter a qualidade do produto durante toda a sua vida útil, mesmo com as possibilidades de falhas de transporte, armazenagem, distribuição, exposição e manuseio dos produtos.

Ao longo de sua vida útil, o produto nunca terá uma qualidade superior à original. Até ser consumido, o alimento estará exposto a uma série de intempéries capazes de promoverem e/ou acelerarem alterações químicas, enzimáticas e/ou microbiológicas, em maior ou menor intensidade, determinando a aceitabilidade por parte do consumidor e, consequentemente, o tempo de vida-de-prateleira, durante o qual ainda não existirá a rejeição do produto pela percepção de alterações nas suas características sensoriais.

Uma embalagem bem desenvolvida é um importante aliado na tentativa de minimizar os efeitos externos sobre o alimento e desacelerar a sua perda de qualidade. Durante muitos anos, a embalagem a vácuo foi um diferencial, uma vez que pela diminuição da disponibilidade de oxigênio, a velocidade de algumas alterações importantes é reduzida, por exemplo aquelas provocadas por microrganismos aeróbios. Para os derivados cárneos, no entanto, a embalagem a vácuo apesar de contribuir para o aumento da vida-de-prateleira, não apresenta efeito sobre as bactérias láticas que são os microrganismos deteriorantes mais comuns neste tipo de produto (DAVE e GHALY, 2011).

Conceitualmente, um dos requisitos para embalagens de alimentos é que a mesma desempenhe um papel passivo, mantendo-se inerte, não interagindo com o alimento nela contido. Entretanto, o advento das embalagens ativas abriu a possibilidade de agregar novos agentes que podem contribuir para a preservação do alimento, sem modificar as características do produto, atendendo à demanda dos consumidores por alta qualidade, segurança e extensão de vida-de-prateleira (MAURIELLO *et al.*, 2004). Absorvedores de oxigênio, emissores de dióxido de carbono e antimicrobianos, são exemplos de agentes que podem ser incorporados às embalagens (RAHEEM, 2012; REVISTA FI, 2011). Entre os antimicrobianos, as bacteriocinas são compostos de natureza protéica cujos estudos na área de alimentos tem demonstrado sua eficiência na redução e/ou controle da multiplicação de microrganismos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

Os estudos conduzidos nos últimos anos sobre bacteriocinas indicam que sua aplicação em alimentos pode trazer uma série de benefícios como: proteção extra durante condições de abuso de temperatura, diminuição do risco de disseminação de microrganismos patogênicos na cadeia de alimentos, menor utilização de conservantes químicos, aumento da vida útil e segurança do produto sem afetar a qualidade nutricional e sensorial, possibilidade de uso de tratamentos mais brandos e influência nos processos tecnológicos, como por exemplo, a redução do tempo de maturação de queijos (GÁLVEZ *et al.*, 2007; VIEIRA, 2011).

Entre as bacteriocinas, a nisin é a única que tem sido empregada nas indústrias de alimentos e seu uso é aprovado mundialmente (ZACHAROF e LOVITT, 2012). A aplicação em produtos cárneos tem sido estudada por diversos autores (BEUCHAT *et al.*, 1997; DAVIES *et al.*, 1999; DE MARTINIS *et al.*, 2002; KRUGER, 2006; BÍSCOLA, 2007; COLAK *et al.*, 2008;

BARROS, 2009; ERCOLINI *et al.*, 2010; WIJNKER *et al.*, 2011; entre outros) tanto aplicada diretamente ao produto quanto incorporada à embalagem.

De forma a contribuir com o estudo da aplicação de nisina nas embalagens de produtos cárneos, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana da nisina incorporada ao envoltório celulósico para mortadela e armazenada em temperatura ambiente.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar a atividade antimicrobiana da nisina incorporada ao envoltório celulósico em diferentes valores de pH, tipos de diluente e concentrações de nisina da solução de hidratação.
- Avaliar a atividade antimicrobiana de envoltório celulósico para mortadela, hidratado com solução de nisina em diferentes temperaturas e tempo de hidratação.
- Avaliar o efeito do envoltório celulósico hidratado com solução de nisina em ácido fosfórico 0,1%, durante a vida útil da mortadela.
- Avaliar o efeito do envoltório celulósico hidratado com solução de nisina em tampão fosfato, pH 6,0, durante a vida útil da mortadela.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MORTADELA

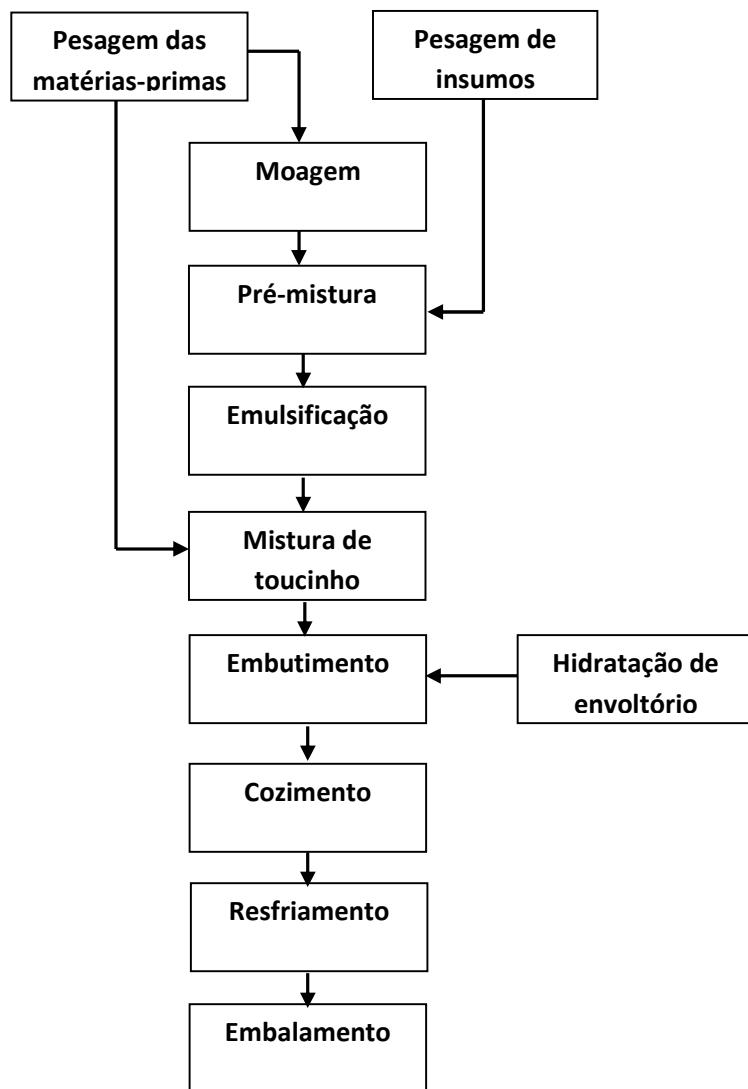
Classifica-se como derivado cárneo, todo aquele no qual as propriedades da carne fresca foram alteradas por um ou mais dos seguintes procedimentos: moagem, floculação ou emulsão, adição de temperos, adição de agentes da cura ou tratamento térmico (CONCEIÇÃO e GONÇALVES, 2009). São geralmente alimentos de baixa acidez, elevada atividade de água e baixo teor de sal (< 2%), características que facilitam sua deterioração assim, para preservação da qualidade são necessários cuidados em toda a cadeia produtiva (MATARAGAS e DROSINOS, 2007).

Dentre os derivados cárneos, a categoria frios e embutidos é composta de produtos como salsicha e salsichão, linguiça (defumada e frescal), presunto, apresuntado, afiambrados, frios diferenciados, salame, mortadela, copa, lombo, presunto Parma e bacon. Segundo dados do IBGE, esta categoria integra um mercado que no período de 2000 a 2008 cresceu a taxas superiores em relação ao Produto Interno Bruto (PIB) do país, durante o qual o PIB acumulou alta de 38,8%, enquanto o volume de vendas de frios e embutidos aumentou 67,6%. Em 2000, o brasileiro consumia em média 1,0 kg/hab/ano em 2009, o consumo médio subiu para 1,7 kg/hab/ano, sendo a mortadela, o terceiro produto com maior participação (19,5%) dentro da categoria frios e embutidos (KUO HUE, 2011). A mortadela é um dos produtos comumente consumidos nos diferentes níveis sociais, faixas etárias, regiões e ambos os sexos. Segundo pesquisa do IBGE (2011), no período de 2008 a 2009, do total de entrevistados, 4,5% consumiam mortadela. Das entrevistadas do sexo feminino, 3,9% consumiam mortadela e entre os homens entrevistados 4,5%. O consumo diminuiu com o aumento da faixa etária sendo que dos entrevistados adolescentes, adultos e idosos, 5,2%, 4,3% e 2,7% respectivamente, alegaram consumir mortadela; as regiões de maiores consumos foram as regiões Sul (8,3% dos entrevistados) e Sudeste (3,9% dos entrevistados) e por classe de rendimento total e variação patrimonial familiar, a maior prevalência (5,1% dos entrevistados) foi verificada na renda entre R\$571,00 e R\$1.089,00 (IBGE, 2011).

De acordo com o Regulamento Técnico de Padrão de Identidade e Qualidade de Mortadela estabelecido pela Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000/MAPA – Anexo II (BRASIL, 2000), a mortadela é obtida de uma emulsão de carnes de animais de açougue, acrescida ou não de

toucinho, adicionada de ingredientes, embutida em envoltório natural ou artificial, em diferentes formas e submetida ao tratamento térmico. Os animais de açougue, de acordo com a Instrução Normativa nº 3, de 17 de janeiro de 2000/MAPA (BRASIL, 2000), são os mamíferos (bovídeos, equídeos, suínos, ovinos, caprinos e coelhos) e aves domésticas, bem como os animais silvestres criados em cativeiro, sacrificados em estabelecimentos sob inspeção veterinária. Para a classificação do produto como Mortadela é permitida a adição de até 60% de carnes mecanicamente separadas de aves, bovinos ou suínos, miúdos comestíveis (estômago, coração, língua, fígado, rins, miolos), pele e tendões até o limite de 10% e gorduras de diferentes espécies de animais de açougue.

O processamento da mortadela (Figura 1) compreende as etapas de pesagem de insumos e matérias-primas cárneas, moagem, pré-mistura das matérias-primas e insumos, emulsificação (que pode ser realizada em cutters ou emulsificadores), mistura de toucinho (se houver), embutimento em envoltórios (hidratados ou não, de acordo com especificação do fabricante), cozimento com defumação (se houver), resfriamento e embalagem (YUNES, 2010).



**Figura 1** - Diagrama de fabricação de mortadela

A matriz protéica da mortadela é formada principalmente por proteínas miofibrilares extraídas na presença de sal e que atuam na estabilização da emulsão, na qual a fase dispersa é composta pelas partículas de gordura, fibras musculares, aditivos, farináceos e a fase contínua, composta por água, sal, proteínas hidrossolúveis e demais elementos solúveis (BORTOLUZZI, 2009).

O ponto principal do processamento de mortadelas é a manutenção da estabilidade da emulsão cárnea que pode ser influenciada por parâmetros de processo (equipamentos, tempo, temperatura), tamanho das partículas de gordura, pH e biodisponibilidade protéica (BARRETTO,

2007). Em geral, o produto pode ser armazenado em temperatura ambiente, estando sujeito, desta forma, a variações de temperatura, conforme o ambiente de exposição.

## 2.2 DETERIORAÇÃO DE MORTADELA

Entende-se por produto deteriorado aquele que apresenta alterações físicas, químicas e/ou organolépticas, em decorrência da ação de microrganismos e/ou por reações químicas, enzimáticas e/ou físicas (BRASIL, 2001).

De maneira geral, os produtos cárneos apresentam uma composição que facilita a deterioração principalmente por microrganismos (CONCEIÇÃO e GONÇALVES, 2009). A vida-de-prateleira da mortadela é definida pelo desenvolvimento da microbiota deteriorante presente, que é influenciada entre outros fatores, pela formulação do produto, temperatura de armazenamento e condições de processo.

Os principais microrganismos envolvidos na alteração das características sensoriais dos derivados cárneos são as bactérias *Pseudomonas*, *Acinetobacter/Moraxella*, *Shewanella putrefaciens*, *Brochotrix thermosphacta*, *Lactobacillus* e algumas espécies da família *Enterobacteriaceae*, as leveduras e os bolores (ALCANTARA *et al.*, 2012). As BAL são, comumente, a maior parte da população deteriorante em produtos embalados a vácuo. A deterioração causada é, primordialmente, devido à produção de metabólitos que provocam modificações como o aumento da acidez tornando o produto mais azedo, produção de exsudado leitoso, degradação da matriz protéica provocando amolecimento principalmente das pontas e estufamento da embalagem devido à produção de gases (DAVE e GHALY, 2011).

As BAL compõem um grupo formado por bactérias Gram-positivas, não esporogênicas, microaerófilas, não redutores de nitrato a nitrito, estritamente fermentativas que produzem ácido lático como principal produto a partir de hexoses. Para se desenvolverem, necessitam de aminoácidos, vitamina B e bases púricas e pirimídicas. Embora sejam mesófilas, podem multiplicar-se em temperaturas abaixo de 5 °C ou acima de 45 °C. Em relação ao pH, a maioria se multiplica numa faixa entre 4,0 e 4,5 (JAY, 2005; GOMES, 2009).

Em função do metabolismo, as BAL podem ser classificadas como homofermentativas (*Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* homofermentativos obrigatórios) ou heterofermentativas (*Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Lactobacillus* heterofermentativas facultativas ou

obrigatórias). As homofermentativas fermentam as hexoses como a glicose, pela via glicolítica também conhecida como Embden-Meyerhof-Parnas, caracterizada pela formação de frutose 1,6-difosfato (FDP), a qual é hidrolisada por uma enzima (frutose 1,6-difosfato aldolase). Na homofermentação, para cada 1 mol de glicose metabolizado, são gerados 2 mol de ácido lático e 2 mol de ATP. Na heterofermentação, a ausência da enzima (frutose 1,6-difosfato aldolase), leva à formação da pentose xilulose 5-fosfato e, posterior hidrólise por uma fosfatoaldolase em gliceraldeído-3-fosfato e acetilfosfato. Um mol de glicose é convertido em quantidades equimolares de ácido lático, etanol e dióxido de carbono e formação de 1 mol de ATP (WISSELINK *et al.*, 2002).

As alterações sensoriais na mortadela provocadas pela multiplicação das BAL são facilmente percebidas pelos consumidores, uma vez que promovem modificações na aparência, textura, odor e sabor, desta forma, o controle da multiplicação destes microrganismos é importante para garantir a qualidade do produto durante a sua vida útil (DAVE e GHALY 2011).

### 2.3 BACTERIOCINAS

As bacteriocinas são compostos de natureza protéica (proteínas ou peptídeos), sintetizadas ribossomicamente por bactérias Gram positivas e negativas como parte do sistema de defesa do microrganismo. Apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre bactérias tais como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (NES *et al.*, 2007). Diferem dos antibióticos quanto à síntese, aplicação, espectro antimicrobiano, modo de ação, mecanismos de resistência e toxicidade. Os antibióticos são metabólitos secundários sintetizados por enzimas, com aplicação clínica, amplo espectro de atividade, mecanismo de ação diverso e toxicidade conhecida, além disso, não podem ser utilizados em alimentos. Já as bacteriocinas são ribossomicamente sintetizadas, possuem espectro limitado de atividade, com ação na membrana citoplasmática. Os dados de toxicidade existem para poucas bacteriocinas, mas pesquisas e o sua utilização intencional já por longo tempo, sugerem que as bacteriocinas são de uso seguro (CLEVELAND *et al.*, 2001).

Entre as bacteriocinas, as que são produzidas por BAL são de especial interesse para aplicação em alimentos, uma vez que: não são tóxicas; são ativas em baixas concentrações; são inativadas por proteases digestivas, tendo pouca influência na microbiota intestinal; são usualmente

tolerantes ao pH e aquecimento; possuem atividade bactericida contra um amplo espectro de bactérias patogênicas e esporuladas (GÁLVEZ *et al.*, 2007; PARADA, 2007). São exemplos de linhagens de BAL produtoras de bacteriocinas: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Nisina), *Lactobacillus sakei* Lb 706 (Sakacina A), *Lactobacillus sakei* 148 (Sakacina M), *Lactobacillus bavaricus* (Bavaricina A), *Leuconostoc carnosum* B-TA 11a (Leucocina B-TA 11a), *Carnobacterium divergens* 750 (Divergicina 750), *Pediococcus acidilactici* L 50 (Pediocina L50) (DE MARTINIS *et al.*, 2002).

Cotter *et al.* (2005) classificaram as bacteriocinas em duas categorias:

- (I) Lantabióticos (classe I): bacteriocinas pequenas compostas de 19 a 38 aminoácidos de comprimento (<5 kDa). Contêm os resíduos dos aminoácidos lantionina ou  $\beta$ -metil-lantionina, os quais formam pontes covalentes entre os aminoácidos, resultando em “anéis” internos e conferindo sua estrutura característica. Além disso, pode conter outros resíduos não usuais que resultam de modificação pós-translacional. São as bacteriocinas mais estudadas e exploradas industrialmente. Agem nas estruturas da membrana celular e são estáveis ao calor. Nesta categoria encontra-se a nisina.
- (II) Não-lantabióticos (classe II): bacteriocinas de peso molecular variável usualmente menor que 10 kDa, relativamente termoestáveis, não apresentando aminoácido lantionina e não estão sujeitos a ampla modificação pós-translacional, como os lantabióticos. Podem ser subdivididas em classe IIa) bacteriocinas com estreito espectro de atividade e alta especificidade contra *L. monocytogenes*. Estas bacteriocinas possuem de 37 a 48 resíduos e apresentam uma ou duas pontes dissulfeto. Classe IIb) bacteriocinas que possuem dois pepetídeos que atuam em sinergismo, pertence a este grupo a plantaricina lactacina F. Class IIc) bacteriocinas com estrutura cíclica.
- (III) Bacteriolisinas (classe III) que são moléculas grandes de proteínas, termolábeis, que tem como mecanismo de ação provocar a lise da célula bacteriana catalisando a hidrólise da parede celular.

O efeito inibitório das bacteriocinas, particularmente os lantabióticos, está relacionado à inibição de células alvos pela formação de poros na membrana celular, desestabilizando e alterando a permeabilidade (redução do potencial e/ou gradiente de pH), resultando no extravasamento de material celular (CLEVELAND *et al.*, 2001).

A produção de bacteriocinas pelas BAL é associada à sua multiplicação, ocorrendo durante toda a fase de multiplicação e cessando no final da fase exponencial. Sua produção é afetada pelo tipo e disponibilidade de fonte de carbono, nitrogênio, fosfatos, cátions surfactantes e inibidores (SAVADOGO *et al.*, 2006).

Os mecanismos de resistência de algumas cepas às bacteriocinas não estão totalmente esclarecidos, mas tem sido atribuído às mudanças na membrana celular ou interrupção de codificação de genes dos sistemas das permeases e das fosfotransferase que realizam transporte de carboidrato. Em relação à toxicidade, são consideradas de uso seguro (PARADA 2007).

## 2.4 NISINA

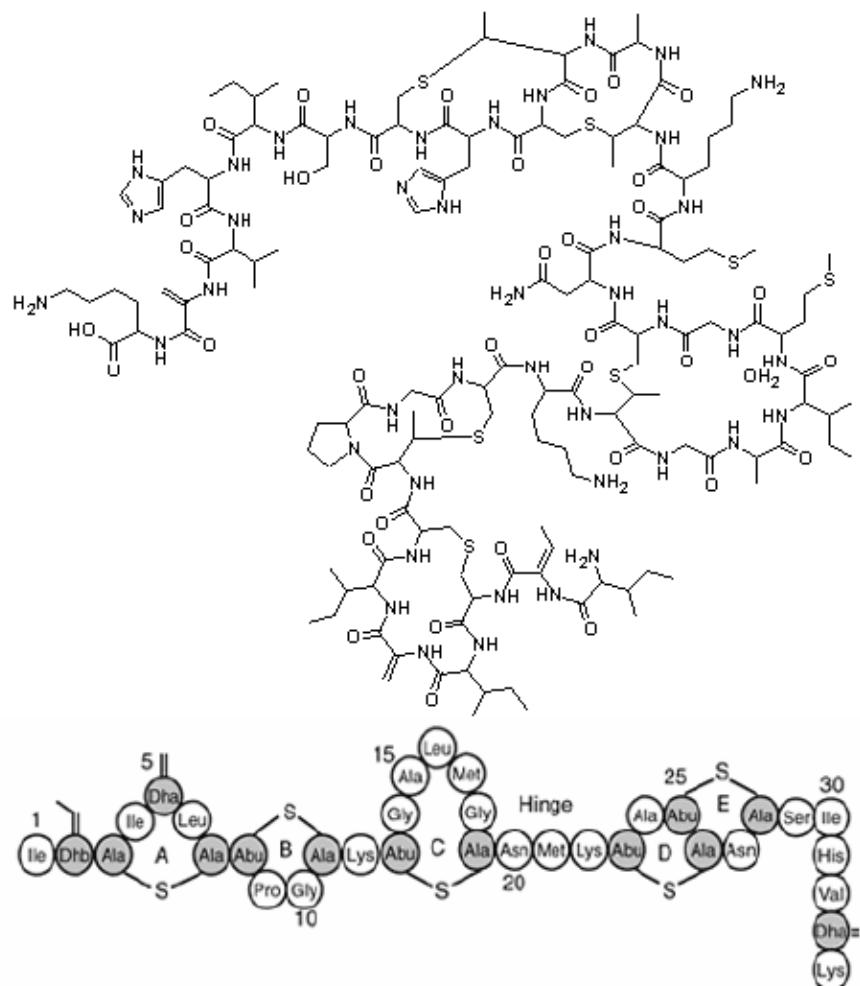
A bacteriocina nisina foi descoberta na Inglaterra em 1928, como resultado de dificuldades experimentais durante um processo de fabricação de queijo. A estocagem de leite permitiu o desenvolvimento da microbiota contaminante e a produção da bacteriocina. A proteína foi isolada e nomeada como nisina (JEEVARATNAM *et al.*, 2005). Está aprovada desde 1969 pela FAO (Food and Agriculture Organization) e WHO (World Health Organization) e sua utilização nos Estados Unidos está autorizada desde 1988 pelo FDA (Food and Drug Administration) como de uso seguro para queijos e sopas termoprocessadas com estocagem refrigerada (ZACHAROF e LOVITT, 2012).

A dose letal é de aproximadamente 7 g/kg de peso corpóreo, similar ao de sal comum. Nenhum efeito tóxico foi verificado quando empregada na alimentação de porcos e frangos. Em 1969, o comitê de aditivos de alimentos do Codex Alimentarius, da FAO estabeleceu uma ingestão diária aceitável de  $3,3 \times 10^4$  unidades/kg de peso corpóreo (JEEVARATNAM *et al.*, 2005; ZDANSKI, 2011). É aprovada como aditivo alimentar e designada sob o número E234 (ECCU 1983 EEC Comission Directive 8314631) pela União Européia (FIELD *et al.*, 2008; ZACHAROF E LOVITT, 2012). Comercialmente produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e no Brasil, a legislação brasileira (BRASIL, 1996) permite seu uso como conservante natural de produtos de natureza biológica, podendo ser utilizada em queijos pasteurizados e na superfície externa de salsicha de diferentes tipos (PARADA *et al.*, 2007; REVISTA FI, 2011; SCHNEIDER *et al.*, 2011).

Desde 1953, a nisina é comercializada como o produto Nisaplin® que contém aproximadamente 2,5% de nisina (correspondente a  $10^6$  UI) em cada grama. É produzida industrialmente por cepas de *Lactococcus lactis*. É estável, não evidenciando perda de atividade por

dois anos, quando estocado em temperatura menor que 25 °C, ambiente seco e sem incidência de luz (DELVES-BROUGHTON, 2005).

A nisina pertence à classe dos lantabióticos, apresenta peso molecular de 3,4 kDA, é composta por 34 aminoácidos, incluindo resíduos não comumente encontrados, como os aminoácidos lantionina e metil-lantionina, e apresenta uma estrutura policíclica contendo cinco pontes de tioéter (ROLLEMA, 1995) (Figura 2).



**Figura 2** - Estrutura primária da nisina (PARADA, 2007).

A nisina possui amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas (inclusive BAL), esporuladas como *Bacillus*, *Clostridium spp.*, sendo os esporos mais sensíveis que as células vegetativas, mas possui pouca ou nenhuma atividade contra bactérias Gram-negativas, leveduras e fungos (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2003; HERMAN *et al.*, 2009). Apresenta ação

bactericida, sendo adsorvida à membrana citoplasmática bacteriana. Estudos demonstram que a nisina interage com o lipídio II (precursor de peptideoglicano ligado à membrana) como uma molécula de complexação, etapa que facilita duas ações bactericidas, a inibição da biossíntese do peptideoglicano e a formação de poros na membrana que favorecem o efluxo de íons de potássio e metabólitos intracelulares como o ATP, provocando a queda de energia e estagnação do processo de biossíntese intracelular (FIELD *et al.*, 2008; WIJNKER *et al.*, 2011).

A atividade antimicrobiana da nisina é dependente das condições do meio e processos a que a bacteriocina é submetida (pH, processamento térmico, etc.), podendo influenciar também na sua solubilidade, adsorção e distribuição. Rollema *et al.* (1995) estudaram a solubilidade e estabilidade das variantes naturais da nisina: Nisina A e Nisina Z, que diferem em apenas um aminoácido na posição 27: a asparagina na Nisina Z é substituída pela histidina na Nisina A (ARAUZ *et al.*, 2009). No estudo, Rollema *et al.* (1995) verificaram que a solubilidade da nisina A é maior em valores menores de pH, decrescendo gradualmente em aproximadamente duas ordens quando o pH se aproxima de 7,0. Já a nisina Z exibiu um decréscimo de solubilidade em baixos valores de pH quando comparado com a nisina A. Em pH neutro e acima, a solubilidade de ambas foram similares. A estabilidade química da nisina em temperatura ambiente mostrou baixa dependência do pH na faixa de 2,0 a 6,0. Já a 37 e 75 °C, a estabilidade ótima foi verificada no pH 3,0.

Liu e Hansen (1990) verificaram uma relação entre a solubilidade da nisina, o pH e a concentração da solução tampão do meio. A solubilidade aumentou com a diminuição do pH, variando de 0,25 mg/ml (pH 8,5), 1,5 mg/ml (pH 6,0), 57 mg/ml (pH 2,0) e foi inversa e linearmente proporcional à concentração da solução tampão de fosfato de sódio, sendo 42% menor no pH 7,0 para a concentração de 0,2 M comparada à 0,05 M.

Herman *et al.* (2009) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de nisina (2,5 a 20,0 ppm) e diferentes faixas de pH (3,5 a 7,0) na multiplicação de *Lactobacillus fructivorans*. De acordo com os resultados, a inibição da multiplicação do microrganismo foi maior quanto mais elevado o pH, verificando o máximo de inibição entre os valores de pH 6,0 e 7,0, independente da concentração de nisina. No pH 3,5 para todas as concentrações testadas, verificou-se atividade antimicrobiana da nisina, diferentemente dos pH 4,0; 4,5 e 5,0, considerando que o crescimento ótimo do *L. fructivorans* ocorre na faixa de pH 4,0-4,5.

O tratamento térmico de uma solução de nisina a 121 °C por 15 min, em pH de 3,0 a 3,5, reduziu a atividade antimicrobiana em apenas 10%, enquanto para valores de pH acima ou abaixo

desta faixa, por exemplo, pH 1 ou 7, a perda de atividade atingiu valores da ordem de 90% (DELVES-BROUGHTON, 2005).

## 2.5 APLICAÇÃO DE NISINA EM PRODUTOS CÁRNEOS

A aplicação de nisina diretamente nos produtos cárneos apresenta algumas limitações, como a interação com outros constituintes do produto, baixa solubilidade no pH acima de 6,0 e inativação pela formação de um complexo com a glutationa presente nas células musculares (GÁLVEZ *et al.*, 2007). Rose *et al.* (2003) isolaram a partir de músculo de carne crua, a enzima glutationa S-transferase, que catalisa a reação entre nisina e glutationa, e verificaram que em temperatura superior a 37 °C, três moléculas de glutationa reagiram com uma molécula de nisina, inativando-a totalmente. Em temperatura de refrigeração (4 °C) a reação foi mais lenta e resultou na adição de uma molécula de glutationa a uma de nisina (GÁLVEZ *et al.*, 2007).

No estudo sobre o efeito da nisina na vida-de-prateleira de salsicha tipo chinesa embalada a vácuo e estocada a 20 °C, Wang (2000) verificou que a multiplicação microbiana e a formação de limosidade típica nesse produto não foi retardada pela aplicação de 100 mg/kg da bacteriocina. Segundo Wang (2000), a ineficiência da nisina pode ter ocorrido em virtude do valor de pH (>6,6), alta temperatura de estocagem, resistência da microbiota presente, ou ainda à possível interferência dos lipídeos e baixa solubilidade.

O teor de gordura pode interferir na distribuição uniforme e tornar a nisina indisponível para ação sobre a(s) bactéria(s) alvo(s). Davies *et al.* (1999) verificaram que a atividade antimicrobiana da nisina em mortadela tipo *Bologna* foi maior em amostras com menor conteúdo de gordura. Reunanen e Saris (2004) estudaram a preservação da atividade antimicrobiana da nisina em salsicha cozida e verificaram que a bacteriocina resistiu ao processo de cozimento e em 10 dias de estocagem a 6 °C, a concentração de nisina detectada foi de 55% em relação à quantidade inicialmente adicionada, porém as análises posteriores ao décimo dia, detectaram um aumento na concentração da bacteriocina, chegando a atingir 68% após 28 dias de estocagem a 6 °C. Os autores concluíram que este fenômeno é explicado pela liberação de gordura do produto durante a estocagem resfriada e concomitante aumento da solubilidade da nisina.

Ainda que a eficiência da nisina aplicada diretamente em produtos cárneos apresente limitações devido aos fatores intrínsecos do alimento, existem estudos que demonstram eficiência

na sua aplicação. Raju *et al.* (2003) estudaram a eficácia da nisina em três diferentes concentrações, na manutenção da qualidade de salsicha de peixe em tripa sintética armazenada à temperatura ambiente e refrigerada. A temperatura e a concentração de nisina influenciaram na força do gel, conteúdo de água, total de base nitrogenada volátil e contagem de microrganismos. A concentração de 50 mg/kg de nisina manteve a aceitabilidade à temperatura ambiente por 20-22 dias comparados com 2 dias da amostra controle. O estudo também comprovou que a diminuição do residual de nisina foi mais lenta na amostra refrigerada.

Davies *et al.* (1999) verificaram que a adição de nisina inibiu o crescimento de BAL inoculadas em mortadela embalada a vácuo (pasteurizada) e estocada a 8 °C. As amostras controles deterioraram em torno do 7º dia, enquanto as amostras tratadas permaneceram sem deterioração por um período maior que 50 dias.

Beuchat *et al.* (1997) estudaram o efeito da nisina na sobrevivência e multiplicação de linhagens de *Bacillus cereus* psicrotrófico, em molho de carne. As células vegetativas estressadas pelo calor apresentaram maior sensibilidade à nisina. O efeito inibitório da nisina foi mais pronunciado a 8 °C em comparação a 15 °C. As células vegetativas apresentaram maior sensibilidade a nisina que os esporos. A multiplicação de células vegetativas e esporos após um período inicial de inibição foi atribuído à perda de atividade da nisina.

## 2.6 COMBINAÇÃO DE NISINA E OUTROS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

A mistura de componentes químicos aplicados em um alimento com o objetivo de melhorar alguma propriedade desejável de uma substância deve ser realizada considerando os possíveis produtos resultantes, tanto da interação entre os dois componentes, quanto destes com a matriz do alimento. Trata-se de uma previsão complexa, especialmente considerando as possíveis variações que a matriz do alimento pode sofrer. Estudos realizados com nisina e outros agentes químicos demonstraram que determinados componentes foram capazes de potencializar a atividade antimicrobiana da bacteriocina, tornando-se de interesse para aplicação em alimentos (BÍSCOLA, 2007).

Samelis *et al.* (2005) avaliaram o efeito da nisina em combinação com ácidos orgânicos e sais, aplicada por imersão em fatias de mortadela suína. A nisina reduziu em aproximadamente 1,0 log UFC/g a contagem inicial de *Listeria monocytogenes*, contudo, a partir do 10º dia, o patógeno

se multiplicou nos produtos onde não foram aplicados ácidos ou sais. A nisina combinada com ácido acético ou diacetato de sódio (3 ou 5 g/ 100 ml) ou 3 g/ 100 ml de benzoato de potássio, não permitiu a multiplicação de *L. monocytogenes* antes de 90 dias.

Zdanski (2011) estudou o efeito da aplicação de antimicrobianos combinados na massa e na superfície de salsichas e verificou que a aplicação conjunta de nisina e ácido lático na superfície, apresentou maior eficiência na redução de bactérias aeróbias mesófilas que a adição dos compostos separadamente.

Cutter *et al.* (2001) concluíram que o uso combinado de nisina e EDTA nos filmes de polímeros (polietileno ou polietileno e óxido de polietileno) promoveu uma redução de *Brochothrix thermosphacta* inoculado na superfície da carne quando comparado à utilização de polímeros de polietileno e nisina.

Kruger (2006) avaliou o efeito de óleo essencial de orégano e de nisina, individualmente e combinados, na massa de linguiça frescal suína estocada a 5 °C na inibição de *L. monocytogenes* Scott A. Quando o óleo essencial 0,5% (v/v) foi combinado com nisina (200 ppm), observou-se um efeito sinérgico na inibição do patógeno. O óleo essencial, isoladamente, não conferiu proteção ao alimento. A aplicação exclusiva da nisina (200 ppm) causou uma redução inicial de 2 log UFC/g, mas durante a estocagem, o patógeno apresentou a mesma velocidade de multiplicação verificada na linguiça controle, mantendo as contagens 2 log UFC/g menores do que aqueles verificados no controle por até 9 dias. Quando combinados, nisina (200 ppm) e óleo essencial de orégano 0,5% (v/v), a redução imediata foi de 4 log UFC/g comparado ao controle, entretanto, a velocidade de multiplicação das células remanescentes durante o armazenamento a 5 °C foi significativamente maior do que a determinada no controle.

Adler *et al.* (2011) avaliaram a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em salmouras contendo diferentes agentes antimicrobianos. As contagens de *Escherichia coli* O157:H7 decresceram abaixo do limite de detecção após 48 horas, nas salmouras formuladas com ácido lático ou ácido acético ou Nisaplin® (0,66%) combinado com EDTA.

Pellicer *et al.* (2011) analisaram o efeito da temperatura, conteúdo de gordura, cloreto de sódio e o uso dos conservantes (nitrito de sódio, ácido lático e nisina) na multiplicação de *L. monocytogenes* no sistema de emulsão cárnea. Os parâmetros foram testados individualmente e combinados. Os autores observaram que combinações do ácido lático com nitrito de sódio ou com

nisina, potencializaram o efeito inibitório. Considerando a baixa toxicidade da nisina, a sua combinação com ácido lático é de interesse para inibição de *L. monocytogenes*.

Nattress e Baker (2003) verificaram que a mistura de lisozima e nisina (3:1) foi efetiva no controle da multiplicação de BAL e *Brochothrix thermosphacta* em lombo suíno embalado a vácuo e estocado à temperatura de 2 °C por 6 semanas. Entretanto, o número de enterobactérias foi maior em amostras tratadas em relação àquelas não tratadas, já que a redução da população de BAL diminuiu a competição e permitiu a multiplicação das enterobactérias.

Mangalassary *et al.* (2008) investigaram a eficácia da pasteurização pós-embalagem a 65 °C por 32 segundos, combinada com nisina e/ou lisozima aplicada na superfície de mortadela de peru com baixo teor de gordura, para reduzir e prevenir a multiplicação de *L. monocytogenes* durante a estocagem refrigerada. A pasteurização (pós-embalagem) combinada com nisina (ou nisina-lisozima) foi efetiva na redução da população microbiana, permanecendo abaixo dos limites de detecção do método de análise no período de 2 a 3 semanas de estocagem.

Colak *et al.* (2008) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de nisina e lactoferrina e suas combinações na qualidade microbiológica de almôndegas de carne bovina. Tratamentos com lactoferrina sozinha e suas combinações com nisina, reduziram significativamente o total de bactérias aeróbias, coliformes, *E. coli*, bactérias psicrófilas, *Pseudomonas spp.* e contagem de fungos e leveduras no alimento. A maior redução ocorreu no tratamento com a mistura de 100 g/g de lactoferrina e 100 g/g de nisina. Esta combinação prolongou a vida-de-prateleira refrigerada para 10 dias, em comparação aos 3 dias obtidos nas amostras controles.

## 2.7 APLICAÇÃO DE NISINA EM EMBALAGENS

As alterações indesejáveis nos alimentos resultam em expressivas perdas econômicas para as indústrias, tornando fundamental a aplicação de tecnologias que aumentem a qualidade e segurança dos produtos. A embalagem representa, de maneira geral, o item de maior custo e sobre o qual a maioria das indústrias interfere buscando o aumento da vida útil do produto alimentício (DALCANTON, 2010). Sua importância também é justificada por constituir a primeira barreira do alimento aos efeitos ambientais aos quais é exposto.

Um avanço na aplicação em alimentos é o uso de bacteriocinas imobilizadas no desenvolvimento de embalagens antimicrobianas (GÁLVEZ *et al.*, 2007).

Scannell *et al.* (2000) estudaram o efeito de um filme à base de celulose, utilizado para separar fatias de alimentos e tratado com nisina (0,03 g/mL), na vida-de-prateleira de presunto cozido e queijo Cheddar fatiados, estocados em temperatura de refrigeração sob atmosfera modificada. Foi verificada além de redução nas contagens de BAL e aumento na vida-de-prateleira dos produtos, redução de aproximadamente 2 log UFC/g na contagem de *Listeria innocua* em ambos os produtos; 1,5 e 2,8 log UFC/g de *S. aureus* no queijo e presunto, respectivamente. No queijo cheddar, a presença do filme tratado teve pouco efeito sobre as contagens de BAL na primeira semana, porém a partir deste ponto, as contagens decresceram significativamente, resultando em uma população final praticamente igual à inicial, ao final de 24 dias de estocagem. No presunto cozido, enquanto as contagens do tratamento controle aumentaram em 4 log UFC/g, não foi detectada a presença de BAL durante toda a vida-de-prateleira.

Barros *et al.* (2010) verificaram que durante todo o período de armazenamento à temperatura de 4 °C a população de bactérias láticas nas salsichas com tripa hidratada em ácido fosfórico e nisina foi menor que no tratamento controle (sem nisina), verificando a maior atividade no 28 ° dia de armazenamento, quando a diferença entre os tratamentos foi de 3 log UFC/g.

O tratamento de um filme plástico (polietileno de baixa densidade) incorporado com nisina reduziu a contagem de *Micrococcus luteus* ATCC 10240 no leite cru e pasteurizado estocado a 4 °C por 7 dias em 0,9 log UFC/g e 1,3 log UFC/g respectivamente, quando comparado ao controle (MAURIELLO *et al.*, 2005).

Um filme celulósico produzido pelo microrganismo *Gluconacetobacter xylinus* K3 e tratado com nisina foi utilizado no estudo do controle de *L. monocytogenes* e bactérias mesófilas aeróbias em salsicha embalada a vácuo. Foi verificada uma redução significativa de até 3 log UFC/g na contagem total de mesófilos aeróbios após 14 dias de estocagem a 4 °C (concentrações de nisina de 625 e 2500 UI/ ml) e uma redução de até 2 log UFC/g na contagem de *L. monocytogenes* após 14 dias de estocagem a 4 °C, concentração de nisina de 2500 UI/ml (NGUYEN *et al.*, 2008).

A nisina também foi incorporada em um filme plástico (polietileno de baixa densidade) utilizado para embalar salmão defumado inoculado superficialmente com *L. monocytogenes* em diferentes concentrações e estocado a 4 e 10 °C. Em ambos os tratamentos, foi verificada redução significativa na contagem de células após 58 e 43 dias de estocagem, respectivamente (NEETOO *et al.*, 2008).

Jin (2010) estudou o efeito antimicrobiano de uma garrafa revestida por uma mistura de polímero poli (ácido lático) (PLA) e nisina, utilizada para embalar clara de ovo e leite desnatado inoculado com *L. monocytogenes* Scott A. O microrganismo não foi detectado na clara do ovo durante o tempo de estocagem de 48 dias na temperatura de 10 °C e por 70 dias na temperatura de 4 °C. Nas amostras de leite desnatado, em ambas as temperaturas testadas, as células foram completamente inativadas após 3 dias e não foram detectadas durante 42 dias de estocagem.

Ercolini *et al.* (2010) avaliaram o efeito do uso de uma embalagem antimicrobiana (saco plástico alta barreira, copolímero de cloreto de vinilideno e etil-vinil-álcool) com incorporação de nisina, HCl e solução de EDTA nas populações microbianas que causam deterioração de cortes de carne resfriada durante a estocagem a 1 °C. A embalagem antimicrobiana promoveu uma redução significativa geral da contagem de bactérias Gram-positivas, como *Carnobacterium sp.*, BAL e *B. thermosphacta*. Também ocorreu uma redução de 1 a 3 log UFC/g na população de enterobactérias. O uso da embalagem ativa reduziu o número de microrganismos deteriorantes, mas não afetou a diversidade de espécies.

A atividade da nisina, no entanto, depende da adsorção do antimicrobiano na embalagem. Melo *et al.* (2006) verificaram uma redução significativa na velocidade de multiplicação de *Staphylococcus sp.* em meio de cultura líquido quando inoculado um filme de base celulósica tratado com nisina e não lavado com solução de NaCl 2% em comparação ao tratamento controle (filme sem nisina) e o filme tratado com nisina e lavado com solução de NaCl 2%. A ausência de inibição para o filme tratado com nisina e lavado com solução de NaCl 2% demonstrou que a nisina incorporada estava fracamente ligada à superfície do filme e foi removida pelo processo de lavagem.

Guerra *et al.* (2005) avaliaram o efeito de diferentes temperaturas (8, 25, 40 e 60 °C) na adsorção da nisina preparada em solução tampão 0,01 M de fosfato de sódio pH 6,0 na superfície do celofane tipo “P”. A máxima adsorção foi verificada para a temperatura de 8 °C. O filme tratado com a solução de nisina e tampão fosfato pH 6,0 mantido na temperatura de 8 °C por 12 horas, foi testado no produto (carne de vitela fresca) e foi verificada redução de aproximadamente 1,5 log UFC/g em relação ao tratamento controle quando estocados a 4 °C por 12 dias.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia foi dividida em: avaliação da atividade antimicrobiana do envoltório hidratado em solução de nisina e estudo de vida-de-prateleira da mortadela embutida em envoltório celulósico tratado com solução de nisina.

Iniciamente, os testes no envoltório foram realizados utilizando o diluente ácido fosfórico 0,1% em diferentes concentrações de nisina, tomando-se por base o estudo realizado por Barros (2009). Uma vez que foi verificada atividade antimicrobiana do envoltório nestas condições (item 4.1.1), foi conduzido o estudo de vida-de-prateleira da mortadela, porém os resultados não foram confirmados (item 4.2.2). A partir deste primeiro resultado, foram realizados testes no envoltório com diferentes condições (diluente, pH, tempo e temperatura de hidratação), buscando-se determinar as melhores condições de adsorção da nisina ao envoltório celulósico e, posteriormente, foi realizado o estudo de vida-de-prateleira para confirmação dos resultados obtidos.

#### 3.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ENVOLTÓRIO CELULÓSICO HIDRATADO EM SOLUÇÃO DE NISINA

Para o estudo da atividade antimicrobiana do envoltório hidratado com solução de nisina, foram avaliados os fatores: concentração de nisina, tipo de diluente, tempo e temperatura da solução de hidratação. Uma vez confirmados os resultados de maior eficiência considerando os fatores acima listados, foi realizado o estudo para avaliar a influência do pH da solução de hidratação na atividade antimicrobiana da nisina aplicada em envoltório celulósico e na tripa natural suína. Para determinação da atividade antimicrobiana, em ambos os casos, foi realizado teste de difusão em ágar, conforme descrito no item 3.1.1.

As amostras de envoltório celulósico (Viscofan do Brasil S.A, São Paulo - SP) foram preparadas cortando-se em quadrados de 2,0 x 2,0 cm.

As soluções de nisina foram preparadas utilizando-se o produto Nisaplin® (DuPont<sup>TM</sup>Danisco®). Cada grama de Nisaplin® contém aproximadamente 2,5% de nisina, o que corresponde a  $10^6$  UI (Unidades Internacionais), ou seja, 1 µg de nisina pura equivale a 40 UI.

- Avaliação do efeito da concentração de nisina

Amostras do envoltório celulósico foram hidratadas em soluções de ácido fosfórico 0,1% contendo diferentes concentrações de Nisaplin® (200, 400, 600, 800, 1000 e 1200 mg/L). As soluções permaneceram a 40 °C e as amostras imersas por 40 minutos. O excesso de solução foi escorrido por 5 segundos, antes da realização do teste de difusão em ágar. Como controle foi utilizada solução de ácido fosfórico 0,1% sem Nisaplin®.

b) Avaliação do efeito do tipo de diluente e do tempo de hidratação

Amostras de envoltório foram imersas em soluções de 1000 mg/L de Nisaplin® nos diferentes diluentes:

- Ácido fosfórico 0,1%;
- Ácido lático 2,5%;
- Ácido acético 2,5%.
- Tampão 0,01 M fosfato de potássio pH 6,0.

As amostras permaneceram imersas por 40 minutos e 12 horas nas soluções, as quais foram mantidas a 40 °C. Após a hidratação, as amostras foram enxaguadas com 1,0 mL de água destilada e deixadas em dessecador por 5 minutos. Como controles foram utilizadas soluções dos diferentes diluentes, sem Nisaplin®.

c) Avaliação do efeito da temperatura da solução de hidratação

Amostras do envoltório foram imersas em solução de ácido fosfórico 0,1% ou tampão fosfato de potássio pH 6,0 e Nisaplin® (1000 mg/L) por 12 horas, mantidas em diferentes temperaturas 8, 25 e 40 °C. Após a hidratação, as amostras foram enxaguadas com 1,0 mL de água destilada e deixadas em dessecador por 5 minutos. Como controle foi utilizada solução de ácido fosfórico 0,1% ou tampão fosfato de potássio pH 6,0, sem Nisaplin®.

d) Avaliação do efeito do pH

As soluções de Nisaplin® (1000 mg/L) foram preparadas com solução tampão de diferentes pH, ácido fosfórico 0,1% e água deionizada a partir de uma solução padrão de Nisaplin® em água deionizada na concentração de 10 g/L. A Tabela 1 apresenta os valores de pH das nove soluções utilizadas.

Quatro amostras de envoltório celulósico e de tripa natural suína (2,0 x 2,0 cm) foram imersas por 40 minutos em 15 mL das diferentes soluções de nisina e mantidas a 40 °C. Após a hidratação, as amostras foram enxaguadas com 1,0 mL de água destilada e deixadas em dessecador por 5 minutos. Como controles foram utilizadas soluções dos diferentes diluentes, sem Nisaplin®.

**Tabela 1** - Valores de pH e concentração dos diluentes utilizados no preparo da solução de Nisaplin®

Diluente	pH	Concentração
Solução ácido fosfórico	2,0±0,3*	0,1%
Solução tampão fosfato dissódico – ácido cítrico	2,5	0,02 -0,1 M
Solução tampão fosfato dissódico – ácido cítrico	3,5	0,02 -0,1 M
Solução tampão (mono) fosfato de potássio monobásico	4,5	0,01 M
Solução tampão fosfato de potássio	6,0	0,01 M
Solução tampão fosfato de potássio	7,0	0,01 M
Solução tampão fosfato de potássio	8,0	0,01 M
Solução tampão (mono) fosfato de potássio dibásico	9,0	0,01 M
Água deionizada	6,1±0,1*	-

\*média e desvio padrão de três repetições.

### 3.1.1. Teste de difusão em ágar

A atividade antimicrobiana do envoltório hidratado em solução de nisina foi avaliada pelo teste de difusão em ágar (LEWUS e MONTVILLE, 1991). Em uma placa de Petri foi adicionado 1,0 mL de uma cultura de *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, previamente cultivada em caldo MRS (De Man Rugosa e Sharpe, Oxoid) por 24 horas a 30 °C, com concentração entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/mL, e cerca de 15 mL de ágar MRS semi-sólido. Após sua solidificação, foi perfurado um poço de 4 mm de diâmetro com o auxílio de um tubo de vidro estéril.

Em cada placa foram colocadas duas amostras de envoltório previamente hidratado em soluções de Nisaplin® e no poço (controle) foram adicionados 40 µL da solução utilizada na hidratação.

As placas permaneceram em refrigeração por 40 minutos e em seguida foram incubadas a 30 °C por 24 horas. A medida dos halos de inibição foi realizada utilizando-se um paquímetro (Mitutoyo Sul Americada Ltda, São Paulo – SP), a partir de mensuração da distância da borda externa do poço ou do envoltório até a borda externa do halo.

### 3.1.2. Avaliação da atividade antimicrobiana remanescente na solução de hidratação

Aplicando método similar ao método de diluição crítica (MAYR-HARTING *et al.*, 1972) foi determinada a atividade antimicrobiana remanescente nas soluções de Nisaplin® pH 4,5, 6,0 e 7,0 após a hidratação do envoltório celulósico e da tripa natural suína. Como controle foram utilizadas as mesmas soluções, sem imersão do envoltório ou tripa.

Para cada solução de nisina, uma alíquota de 100 µL foi coletada e foram realizadas diluições seriadas (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128) no diluente específico de cada solução.

Foi realizado o teste de difusão em ágar utilizando as amostras resultantes das diluições seriadas. Uma unidade arbitrária (UA) foi definida como o recíproco da maior diluição em que foi observado um halo de inibição. O cálculo da atividade da nisina foi expressa em UA/mL.

## 3.2 ESTUDO DA VIDA-DE-PRATELEIRA DE MORTADELA UTILIZANDO ENVOLTÓRIO CELULÓSICO HIDRATADO EM SOLUÇÃO DE NISAPLIN®

A atividade antimicrobiana da nisina, incorporada em envoltório celulósico, na vida útil de mortadela foi avaliada utilizando dois diferentes diluentes no preparo da solução de hidratação. A metodologia dos experimentos realizados com o envoltório hidratado em solução de nisina preparada em ácido fosfórico 0,1% e em tampão fosfato de potássio (pH 6,0), estão apresentadas nos itens 3.2.1 e 3.2.2 respectivamente.

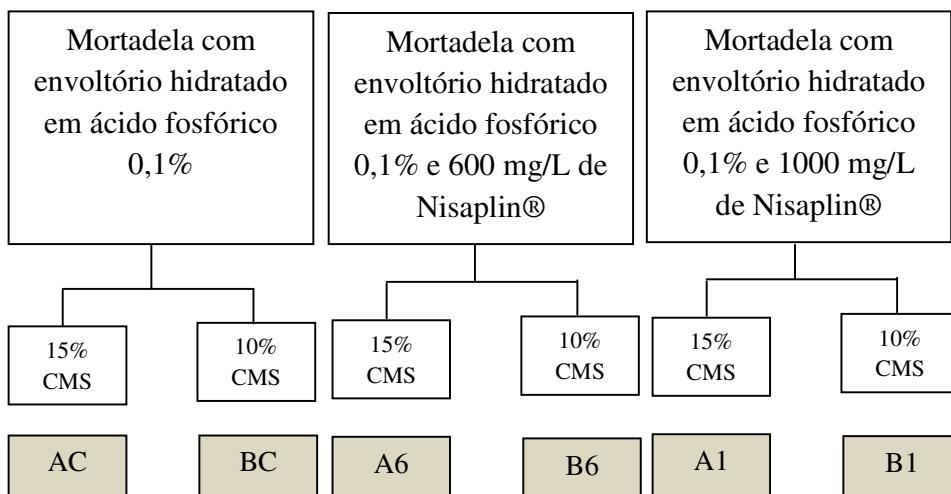
### 3.2.1. Atividade antimicrobiana do envoltório celulósico, hidratado em solução de Nisaplin® em ácido fosfórico 0,1%, aplicado à mortadela.

Com base nos testes preliminares, foram selecionadas duas concentrações de Nisaplin® (600 e 1000 mg/L) em diluente ácido fosfórico 0,1% para hidratação do envoltório a ser usado na fabricação da mortadela.

Para cada concentração de Nisaplin®, foram avaliadas duas formulações de mortadela com diferentes porcentagens (10,0 e 15,0%) de Carne Mecanicamente Separada (CMS) de aves, com o objetivo de verificar sua influência na vida útil do produto. Foram realizados 6 tratamentos repetidos em três blocos (Tabela 2 e Figura 3).

**Tabela 2** - Tratamentos com três réplicas da mortadela considerando os fatores concentração de Nisaplin® e concentração de CMS

Tratamento	Nisaplin® (mg/L)	% CMS
A1	1000	15,0
A6	600	15,0
AC	0	15,0
B1	1000	10,0
B6	600	10,0
BC	0	10,0



**Figura 3** - Esquema de tratamentos das mortadelas A e B considerando os fatores concentração de Nisaplin® e concentração de CMS.

### 3.2.1.1 Formulação e processamento da mortadela

Foram avaliadas duas formulações de mortadelas diferindo entre si pelo balanceamento das carnes. Na formulação A foi adicionado 15% de CMS e na formulação B, 10% (Tabela 3). Para manter o balanceamento da formulação, a diferença de peso da formulação B foi corrigida com adição de carne suína.

**Tabela 3** - Formulações das Mortadelas

Ingrediente	Formulação A (%)	Formulação B (%)
Carne suína	26,0	31,0
Carne Mecanicamente Separada de aves (CMS)	15,0	10,0
Carne Bovina	13,0	13,0
Gelo	25,0	25,0
Toucinho	6,5	6,5
Fécula de mandioca	6,0	6,0
Pré-mix*	5,9	5,9
Lactato de sódio	2,2	2,2
Condimento para mortadela	0,4	0,4
<b>Total</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

\*Pré-mix composto de Sais de cura (nitrito e nitrato de sódio), alho, sal refinado, glutamato monossódico, tripolifosfato e eritorbato de sódio.

O processamento da mortadela foi realizado na planta industrial da empresa Marba Ltda, São Bernardo do Campo, SP.

As matérias-primas, previamente moídas, e os insumos foram adicionados em cutter com capacidade de 220 L (Incomaf Ind. Com. de máquinas para frigoríficos Ltda, Itaquaquecetuba – SP) até emulsificação, a temperatura de saída máxima foi de 12,0 °C. A seguir, a massa foi adicionada de toucinhos picados e misturada a vácuo por 2 minutos em misturadeira 700 L (Incomaf Ind. Com. de máquinas para frigoríficos Ltda, Itaquaquecetuba – SP).

Uma massa de aproximadamente 5,5 kg foi embutida no envoltório celulósico, previamente hidratado em solução de ácido fosfórico 0,1% e Nisaplin®, nas concentrações de 600 mg/L ou 1000 mg/L, por 40 min a 40 °C. Como controle foi utilizado o envoltório hidratado em solução de ácido fosfórico 0,1%, sem adição de Nisaplin®.

O cozimento das peças foi realizado em estufas de aço inox modulares (Brusinox Ind. e Com. de máquinas e equipamentos, Brusque - SC) com ar seco por cerca de 9 horas até que o centro das peças atingisse 75 °C.

Após o cozimento, as peças foram resfriadas em chuveiros de água à temperatura ambiente por cerca de 1 hora e o resfriamento concluído em câmara de resfriamento mantida em temperatura

de 10,0 °C, até que a temperatura do centro da peça atingisse 30 °C, aproximadamente 5 horas após o processo de cozimento.

Para a embalagem, as extremidades do produto foram cortadas com alicate higienizado e as peças acondicionadas em embalagem plástica de alta barreira (Cryovac Sealed Air Corporation, São Paulo-SP) e termoencolhidas em túnel de vapor.

Os produtos foram armazenados em estufas com temperatura controlada de  $(25,0 \pm 0,1)$  °C.

### 3.2.2. Avaliação da atividade antimicrobiana do envoltório celulósico, hidratado em solução de Nisaplin® em tampão fosfato pH 6,0, aplicado à mortadela.

A formulação B da mortadela, apresentada na Tabela 3, contendo 10% de CMS, foi selecionada para realização dos experimentos em que o envoltório celulósico foi hidratado em tampão fosfato pH 6,0. O processamento da mortadela foi realizado na planta piloto da Engenharia de Alimentos do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, em São Caetano do Sul, SP.

As matérias-primas cárneas, previamente moídas, e os insumos foram adicionados ao cutter com capacidade de 7 L (Geiger Ind. de Máquinas Ltda., Pinhais – PR) até emulsificação, a temperatura de saída máxima foi de 12,0 °C. A seguir, a massa foi adicionada de toucinhos picados e misturada por 2 minutos.

Os envoltórios celulósicos foram hidratados em solução tampão de potássio pH 6,0 e Nisaplin® na concentração de 1000 mg/L e mantida à temperatura de 40 °C por 40 minutos. Como controle foi utilizado o envoltório hidratado em solução tampão de fosfato de potássio pH 6,0, sem adição de Nisaplin®.

Uma massa de aproximadamente 0,7 kg foi embutida nos envoltórios celulósicos e o cozimento realizado em estufa com renovação e circulação de ar (Marconi equipamentos para laboratórios Ltda, Piracicaba – SP) por cerca de 8 horas até que o centro das peças atingisse 75 °C.

Após o cozimento, as peças foram resfriadas em água corrente por cerca de 1 hora e o resfriamento foi concluído em temperatura ambiente até que a temperatura do centro da peça atingisse 30 °C.

Para a embalagem, as extremidades do produto foram cortadas com alicate higienizado e as peças acondicionadas em embalagem plástica de alta barreira a vácuo (Cryovac Sealed Air Corporation, São Paulo-SP) e termoencolhida em água fervente.

Os produtos foram armazenados em estufas com temperatura controlada de  $(25,0 \pm 0,1)$  °C.

### 3.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o estudo da atividade antimicrobiana do envoltório celulósico hidratado em solução de nisina foram avaliados cinco fatores: concentração de Nisaplin®; temperatura da solução de hidratação; tipo de diluente; tempo de hidratação e pH da solução.

Os fatores concentração de nisina (200, 400, 600, 800, 1000 e 1200 mg/L) e o pH da solução de hidratação (2,0; 2,5; 3,5; 4,5; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0) foram avaliados separadamente.

O tipo de diluente e o tempo de hidratação foram avaliados de acordo com um planejamento fatorial 4×2, conforme níveis descritos na tabela 4 (BRUNS et al., 1995).

**Tabela 4** - Níveis dos fatores tipo de diluente e tempo de hidratação

Fator	Níveis
Tipo de diluente	Ac. fosfórico, ac. lático, ac. acético, tampão fosfato pH 6,0
Tempo de hidratação	40 min, 12 h

A temperatura de hidratação (8, 25 e 40 °C) foi avaliada para duas soluções de Nisaplin® (ácido fosfórico 0,1% e tampão fosfato pH 6,0), de acordo com um planejamento fatorial 3×2 (BRUNS et al., 1995). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

Para o estudo da atividade antimicrobiana do envoltório hidratado em solução de ácido fosfórico 0,1% e Nisaplin® na vida útil da mortadela, foram considerados como fatores (variáveis independentes): concentração de Nisaplin® (0, 600, 1000 mg/L), concentração de CMS (10 e 15%), tempo de armazenamento (30, 45 e 60 dias), amostragem (centro e superfície das peças de mortadela) e três blocos (réplicas de processamento). Como resposta (variável dependente) foi considerada a contagem de bactérias mesófilas e de bactérias láticas.

A influência da solução tampão fosfato de potássio pH 6,0 e nisina aplicada ao envoltório na vida útil da mortadela, foi comparada com o controle, ou seja, mortadela embutida em envoltório hidratado em solução tampão fosfato pH 6,0, sem nisina. No total foram avaliados dois tratamentos com dois blocos.

Os resultados foram avaliados através de Análise de Variância e a comparação das médias pelo método de Duncan, utilizando-se o software Minitab<sup>TM</sup>, versão 16 (Minitab, Inc. State College, EUA).

### **3.4 Análises Microbiológicas**

As análises microbiológicas das mortadelas embutidas em envoltório hidratado em solução de ácido fosfórico 0,1% foram realizadas após 1, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 25 °C. As amostras foram coletadas do centro e da superfície da peça de mortadela, com o objetivo de avaliar a população microbiana presente na mortadela imediatamente abaixo do envoltório e no centro do produto.

As análises microbiológicas da mortadela embutida em envoltório hidratado em solução tampão fosfato de potássio pH 6,0 foram realizadas após 1, 15, 30, 40 e 50 dias de armazenamento a 25 °C. Com base nos resultados obtidos para o teste com ácido fosfórico 0,1% (item 4.2.2), considerando a condição mais crítica, as amostras foram coletadas da superfície das peças de mortadela, imediatamente abaixo do envoltório celulósico.

#### **3.4.1 Contagem de bactérias mesófilas aeróbias**

Uma amostra de 25 g de mortadela foi acondicionada em saco plástico polietileno (Whirl-Pak®-Nasco), adicionada de 225 mL de água peptonada a 0,1% esterilizada. A seguir, o material foi homogeneizado com o auxílio de Stomacher® (Stomacher® 400, Seward Ltd., Reino Unido) durante 2 minutos em 140 W de potência.

Diluições decimais seriadas foram realizadas e 1,0 mL de cada uma delas foi transferido para placas de Petri, às quais foi adicionado o meio Ágar Padrão para Contagem (PCA), seguindo a técnica de semeadura em profundidade (“pour plate”). Após solidificação, as placas foram incubadas a (35±1) °C por 48 h (MORTON, 2001).

#### **3.4.2 Contagem de bactérias láticas**

Uma amostra de 25 g de mortadela foi acondicionada em saco plástico polietileno (Whirl-Pak®-Nasco), adicionada de 225 mL de água peptonada a 0,1% esterilizada. A seguir, o material foi homogeneizado com o auxílio de Stomacher® (Stomacher® 400, Seward Ltd., Reino Unido) durante 2 minutos em 140 W de potência.

Diluições decimais seriadas foram realizadas e 1,0 mL de cada uma delas foi transferido para placas de Petri e o meio MRS ágar adicionado, seguindo a técnica de semeadura em profundidade (“pour plate”). Após solidificação, as placas foram invertidas e incubadas a 30 °C por 48 h em jarra de anaerobiose (SILVA *et al.*, 1997).

### **3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS**

As análises físico-químicas foram realizadas nas amostras com um dia de fabricação.

#### **3.5.1 Determinação de umidade (Método Gravimétrico Estufa)**

Para determinação da umidade, foram pesadas amostras em triplicata de 5 g do produto homogeneizado em recipientes previamente tarados. Os recipientes contendo as amostras foram mantidos em estufa a 105 °C. Após 3 horas, os recipientes contendo as amostras foram retirados da estufa, resfriados em dessecador, repesados e retornados para a estufa. O procedimento foi repetido até a constatação de peso constante (AOAC, 1995).

#### **3.5.2 Determinação de proteína (Método Micro-Kjeldahl – Nx6,25)**

Para a determinação de proteína, foram pesadas amostras de 0,25 g do produto homogeneizado, transferidas para o tubo de Kjeldahl, sendo adicionados a mistura catalítica e o ácido sulfúrico. A seguir, o material foi aquecido em bloco digestor, com posterior resfriamento, digestão e destilação da amostra. A partir da determinação da porcentagem de nitrogênio total, considerando-se o fator 6,25, determinou-se o teor de proteína (AOAC, 1995).

#### **3.5.3 Determinação de gordura (Extração com solvente orgânico)**

Para a determinação da gordura, foi utilizada a amostra resultante da determinação da umidade. A amostra foi transferida para o extrator Soxhlet para extração com solvente. Após a extração, foi realizada a evaporação do solvente seguida de resfriamento em dessecador e repesagem da amostra. O procedimento foi repetido até peso constante. O teor de gordura foi determinado pela diferença entre o peso final e inicial da amostra (AOAC, 1995).

### 3.5.4 Determinação de cinzas

Para determinação do teor de cinzas foi pesada, em cadinho de peso conhecido, uma amostra de 1 g de produto homogeneizado. A seguir, o cadinho foi colocado dentro da mufla (Q318M, Quimis® Aparelhos científicos, Brasil) à temperatura de 550 °C para incineração (AOAC, 1995).

### 3.5.5 Determinação de carboidratos

O conteúdo de carboidrato foi determinado por diferença: calculou-se a média da porcentagem de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas, o restante foi considerado carboidrato (SILVA e QUEIROZ, 2002).

### 3.5.6 Determinação de pH

Para determinação do pH foi pesada em bêquer uma amostra de 10 g de produto homogeneizado. A seguir, foram adicionados 100 mL de água destilada previamente fervida e resfriada até temperatura ambiente. A mistura foi homogeneizada manualmente e a leitura foi realizada utilizando-se um pHmetro com eletrodo de penetração aferido em solução para calibração pH 4,0 e pH 7,0 (Tecnal equipamentos para Laboratório Ltda, Piracicaba – SP) conforme descrito em Terra e Brum (1988).

### 3.5.7 Determinação de atividade de água (aw)

Determinada a atividade de água de uma amostra de produto previamente homogeneizado cuja leitura foi realizada em equipamento específico para a finalidade (Acqualab 3E, Decagon Devices Inc., USA) à temperatura de 25 °C, segundo as instruções fornecidas pelo fabricante.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NISINA INCORPORADA AO ENVOLTÓRIO

##### 4.1.1 Avaliação do efeito da concentração de Nisaplin®

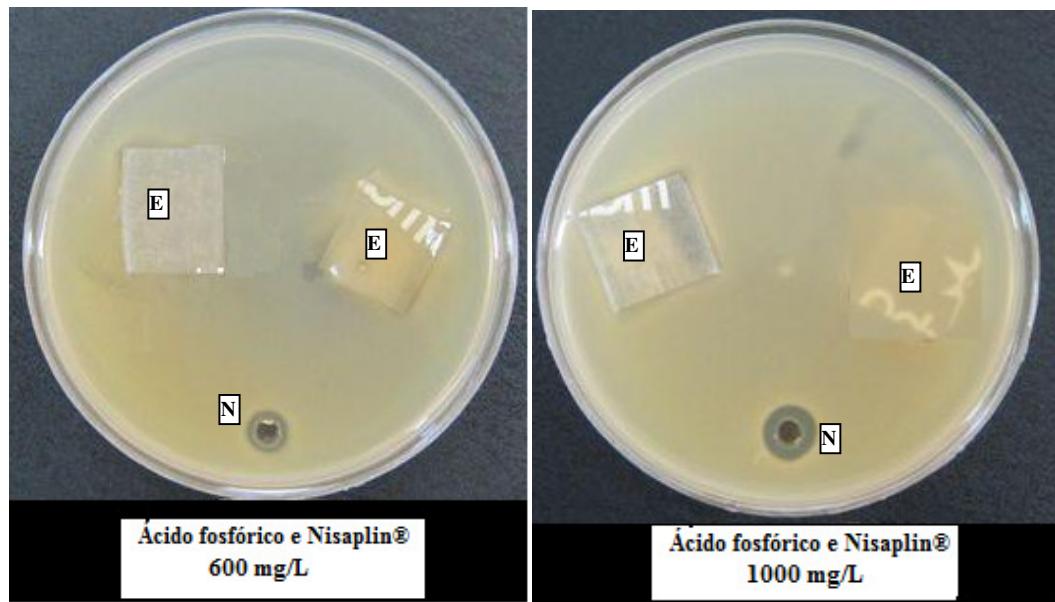
Os resultados do teste de difusão em ágar para as diferentes concentrações de Nisaplin® são apresentados na Tabela 5. Não foi evidenciada a formação de halo de inibição no envoltório para as concentrações de 200 e 400 mg/L. Os halos nos envoltórios foram significativamente ( $p<0,05$ ) menores que os halos das soluções de hidratação nas concentrações de 600, 800 e 1000 mg/L. Para a concentração de 1200 mg/L a diferença entre poço e envoltório não foi significativa ( $p>0,05$ ). Os halos da solução de hidratação foram significativamente maiores quanto maior a concentração de Nisaplin®, sendo que para o halo de inibição do envoltório foi verificada diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as concentrações 600 e 1000 mg/L; 800 e 1000 mg/L. Com base nos resultados, foram selecionadas as concentrações de 600 e 1000 mg/L para aplicação em mortadela.

A Figura 4 apresenta imagens dos halos de inibição para os envoltórios e soluções de hidratação nas concentrações de 600 e 1000 mg/L de Nisaplin®.

**Tabela 5** – Resultados obtidos a partir dos testes de difusão em ágar para avaliação do efeito inibitório do envoltório (testado em duplicata) hidratado em soluções de ácido fosfórico 0,1% e adicionados de Nisaplin® a 600 ou 1000 mg/L

Nisaplin®(mg/L)	Medida dos halos de inibição (média±desvio padrão)	
	Poço (mm)	Envoltório (mm)
200	1,1 <sup>A</sup> ±0,1	0
400	1,2 <sup>AB</sup> ±0,3	0
600	1,6 <sup>aB</sup> ±0,1	1,2 <sup>bA</sup> ±0,1
800	2,5 <sup>aC</sup> ±0,4	1,3 <sup>bA</sup> ±0,1
1000	2,6 <sup>aC</sup> ±0,7	2,1 <sup>bB</sup> ±0,1
1200	3,0 <sup>aD</sup> ±0,4	2,0 <sup>aAB</sup> ±0,1
Sem adição	0	0

a, b médias com letras diferentes na mesma linha, apresentam diferença significativa ( $p<0,05$ ).  
A, B, C, D médias com letras diferentes na mesma coluna, apresentam diferença significativa ( $p<0,05$ ).



**Figura 4** – Teste de difusão em ágar de envoltórios (E), testados em duplicata, hidratados em solução de ácido fosfórico 0,1% e Nisaplin® a 600 mg/L e 1000 mg/L e poço (N) contendo a solução de hidratação com nisina.

#### 4.1.2 Avaliação do efeito do tipo de diluente e tempo de hidratação

Na Tabela 6 são apresentados os resultados do teste de difusão em Agar para os diferentes tipo de diluentes (ácido acético 2,5%, ácido láctico 2,5%, ácido fosfórico 0,1%, tampão fosfato pH 6,0) com 1000 mg/L de Nisaplin® e o tempo de hidratação (40 minutos e 12 horas). Os controles são as soluções nas mesmas condições, sem adição de Nisaplin®.

**Tabela 6** – Resultados obtidos a partir do teste de difusão em ágar do envoltório hidratado e solução de hidratação (com e sem nisina) mantidos a 40 °C em diferentes tempos e diluentes

	Medidas dos halos de inibição (mm)							
	Ácido Lático 2,5%		Ácido Acético 2,5%		Ácido fosfórico 0,1%		Tampão fosfato pH 6,0	
	C	N	C	N	C	N	C	N
Solução/40 min	0	1,9 <sup>aA</sup> ±0,1	0	2,0 <sup>aA</sup> ±0,1	0	1,9 <sup>aA</sup> ±0,1	0	2,0 <sup>aA</sup> ±0,1
Envoltório/40 min	0	0	0	0	0	0	0	1,0 <sup>B</sup> ±0,1
Solução/12 h	0	2,0 <sup>aA</sup> ±0,1	0	2,1 <sup>aA</sup> ±0,1	0	1,9 <sup>aA</sup> ±0,2	0	2,1 <sup>aA</sup> ±0,1
Envoltório/12 h	0	0	0	0	0	0	0	2,6 <sup>C</sup> ±0,2

C – controle, N – com 1000 mg/L de Nisaplin®.

a, b médias com letras diferentes na mesma linha, apresentam diferença significativa ( $p<0,05$ ).

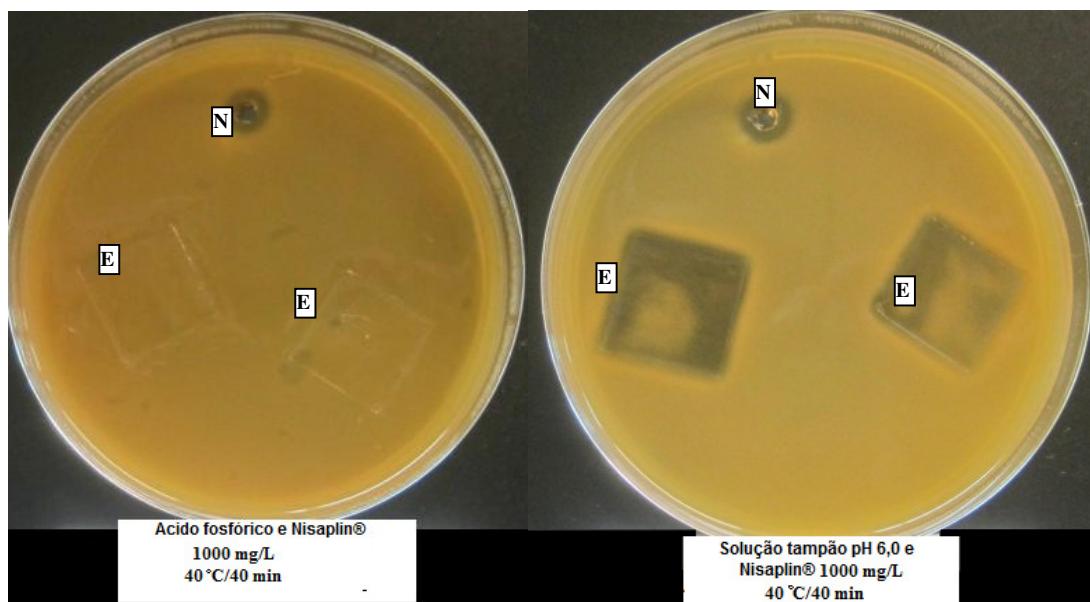
A, B, C médias com letras diferentes na mesma coluna, apresentam diferença significativa ( $p<0,05$ ).

Avaliando o efeito do diluente na atividade antimicrobiana, as soluções de Nisaplin® em ácido lático 2,5%, ácido acético 2,5% e ácido fosfórico 0,1% não evidenciaram halo de inibição no envoltório para os dois tempos testados (40 minutos e 12 horas), porém foi verificada atividade antimicrobiana para o envoltório hidratado em solução tampão fosfato pH 6,0, conforme a Tabela 6. As soluções controles (sem adição de Nisaplin®) e os envoltórios hidratados em solução controle não apresentaram halos de inibição. A Figura 5 mostra o teste de difusão em ágar realizado com o envoltório hidratado em solução de nisina em ácido fosfórico 0,1% em comparação com a solução tampão fosfato pH 6,0.

O resultado deste teste foi contrário ao resultado obtido na avaliação do efeito da concentração de Nisaplin® (Tabela 5), não sendo evidenciado halo de inibição para o envoltório hidratado na solução de ácido fosfórico 0,1%. Possivelmente, a nisina adsorvida ao envoltório celulósico estava fracamente ligada, sendo removida durante a lavagem com água destilada, procedimento não realizado no teste de avaliação da concentração de nisina e a atividade antimicrobiana observada foi resultado de um excedente de solução que permaneceu no envoltório após a hidratação. Resultado similar foi observado por Melo *et al.* (2006) ao avaliar a atividade antimicrobiana de um filme à base de celulose adicionado de nisina, lavado ou não com solução de NaCl 2% sobre a multiplicação de *Staphylococcus* sp. O filme incorporado com nisina e submetido à etapa de lavagem não diferiu ( $p>0,05$ ) do filme sem incorporação de nisina, indicando que a nisina estava fracamente ligada à superfície do filme e foi removida pelo processo de lavagem.

O maior halo de inibição foi verificado para a solução de Nisaplin® em tampão fosfato pH 6,0 para o tempo de 12 horas de hidratação diferindo significativamente ( $p<0,05$ ) do halo para o tempo de 40 minutos de hidratação (Tabela 6). Guerra *et al.* (2005) ao estudar a cinética de adsorção da nisina na superfície de celofane a 25 °C, verificaram que a adsorção de nisina inicialmente apresenta um aumento exponencial nas primeiras 12 horas de incubação, estabilizando em seguida em um patamar de adsorção, demonstrando que são necessárias 12 horas para que se atinja o equilíbrio.

As soluções contendo Nisaplin® adicionadas aos poços, não diferiram entre si significativamente ( $p>0,05$ ).



**Figura 5** - Teste de difusão em ágar de envoltórios (E), testado em duplicata, hidratados em solução de Nisaplin® 1000 mg/L em ácido fosfórico 0,1% e em solução tampão fosfato de potássio pH 6,0, por 40 minutos 40°C. Poço (N) contendo as mesmas soluções de hidratação com nisina.

#### 4.1.3 Avaliação do efeito da temperatura de hidratação

Não foi verificada atividade antimicrobiana para os controles e os envoltórios hidratados em solução de Nisaplin® e ácido fosfórico 0,1%, nas temperaturas de 8, 25 e 40 °C (Tabela 7). Os envoltórios hidratados em solução de Nisaplin® em tampão fosfato de potássio pH 6,0

apresentaram inibição nas temperaturas de 25 e 40 °C, sendo que à 40 °C o efeito antimicrobiano foi significativamente maior. Não houve inibição para a temperatura de 8 °C.

O resultado diferiu do que foi observado por Guerra *et al.* (2005), os quais utilizaram solução tampão 0,01 M de fosfato de sódio pH 6,0 e nisina em filme plástico celofane e verificaram que a melhor adsorção da nisina ocorreu na temperatura de 8 °C. Segundo o autor, a elevação da temperatura aumenta o estado de agitação das moléculas da proteína diminuindo a força de atração entre estas e a superfície sólida. O aumento na quantidade de proteína adsorvida em baixas temperaturas pode estar relacionado a uma redução na energia translacional da proteína, que pode melhorar seu posicionamento para adsorção ou para a redução na energia disponível para desorção (GUERRA *et al.*, 2005 *apud* KIM e HONG, 2000).

Segundo Karam *et al.* (2013), métodos físicos de adsorção são determinados principalmente pelas ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre os antimicrobianos e as superfícies. Fatores como composição química, hidrofilicidade/hidrofobicidade, carga elétrica da superfície, rugosidade, etc., afetam a adsorção à superfície. Além disso, a adsorção pode ser otimizada por combinações adequadas das condições de tratamento como tempo de contato, concentração do antimicrobiano, pH da solução e temperatura de adsorção. Uma vez que a recomendação do fabricante é que o envoltório seja hidratado em água na temperatura de 40 °C por 40 minutos com objetivo de deixá-lo mais flexível para o manuseio durante o embutimento, permitir a expansão e aderência durante a etapa de cozimento. Acredita-se que, o material possa conter em sua composição, compostos que melhorem a difusão da solução, aumentando a permeabilidade, força iônica ou retenção do peptídeo nesta temperatura e favorecendo desta forma, a incorporação da nisina à embalagem, superando o grau de agitação das moléculas promovido pela elevação da temperatura.

A Figura 6 apresenta as imagens dos halos de inibição para a solução de Nisaplin® e tampão fosfato de potássio pH 6,0 nas temperaturas de 25 e 40 °C.

O halo de inibição das soluções adicionadas aos poços (controles) não diferiram significativamente entre si ( $p>0,05$ ).

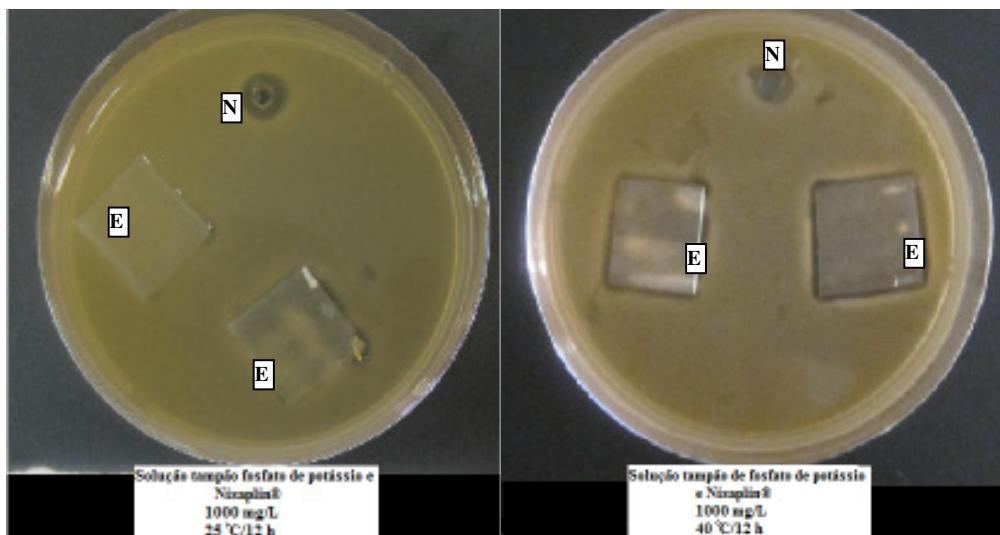
**Tabela 7** – Resultados obtidos a partir do teste de difusão em ágar do envoltório hidratado e solução de hidratação (com e sem nisina) mantidos em diferentes temperaturas por 12 horas

	Medida dos halos de inibição (mm)			
	Ácido fosfórico 0,1%		Tampão fosfato pH 6,0	
	C	N	C	N
Solução 8 °C	0	2,0 <sup>aA</sup> ±0,1	0	2,0 <sup>aA</sup> ±0,2
Envoltório 8 °C	0	0	0	0
Solução 25 °C	0	2,1 <sup>aA</sup> ±0,1	0	2,1 <sup>aA</sup> ±0,1
Envoltório 25 °C	0	0	0	1,3 <sup>AB</sup> ±0,6
Solução 40 °C	0	2,0 <sup>aA</sup> ±0,1	0	2,0 <sup>aA</sup> ±0,1
Envoltório 40 °C	0	0	0	2,5 <sup>C</sup> ±0,1

C – controle, N – com 1000 mg/L de Nisaplin®.

a,b médias com letras diferentes na mesma linha, apresentam diferença significativa ( $p<0,05$ ).

A,B médias com letras diferentes na mesma coluna, apresentam diferença significativa ( $p<0,05$ ).



**Figura 6** - Teste de difusão em ágar de envoltórios (E), testados em duplicata, hidratados em solução tampão de fosfato de potássio pH 6,0 e 1000 mg/L Nisaplin® (temperatura de hidratação 25, 40 °C/12 horas). Poço (N) contendo a mesma solução de hidratação com nisina.

#### 4.1.4 Avaliação da atividade antimicrobiana em diferentes valores de pH

De acordo com a Tabela 8, verificou-se que para a tripa suína os maiores halos de inibição foram verificados para solução tampão pH 6,0 e água deionizada, diferindo significativamente ( $p<0,05$ ) dos demais diluentes. Verificou-se que houve atividade antimicrobiana em toda a faixa de pH estudada (2,0 a 9,0).

Para a solução de hidratação adicionada ao poço, os maiores halos de inibição foram verificados para as soluções tampão pH 4,5 e 6,0 não diferindo significativamente entre si ( $p>0,05$ ), mas diferindo significativamente ( $p<0,05$ ) dos demais diluentes, com exceção do ácido fosfórico 0,1% e água deionizada.

Para o envoltório celulósico, a maior atividade antimicrobiana foi verificada para os diluentes tampão 4,5; 6,0 e água deionizada, não diferindo significativamente entre si, mas diferindo significativamente dos demais diluentes. Não foi verificada atividade antimicrobiana para pH abaixo de 3,5. Os resultados confirmaram as observações dos testes anteriores, demonstrando que a maior adsorção da nisina ao envoltório celulósico ocorreu na faixa de pH entre 4,5 e 6,0, considerando que o pH da água deionizada foi de 6,1. Além disso, o pH 6,0 pode também ter facilitado a transferência da nisina às células bacterianas. Yang *et al.* (1992), ao estudar a adsorção de nisina às células de *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 e *Lactobacillus plantarum* NCDO 955. A maior adsorção da nisina ocorreu em pH próximo a 6,0 (máximo 6,5) e nenhuma adsorção foi verificada em pH abaixo de 3,0.

As Figuras 7, 8 e 9 ilustram os halos de inibição para cada diluente utilizado.

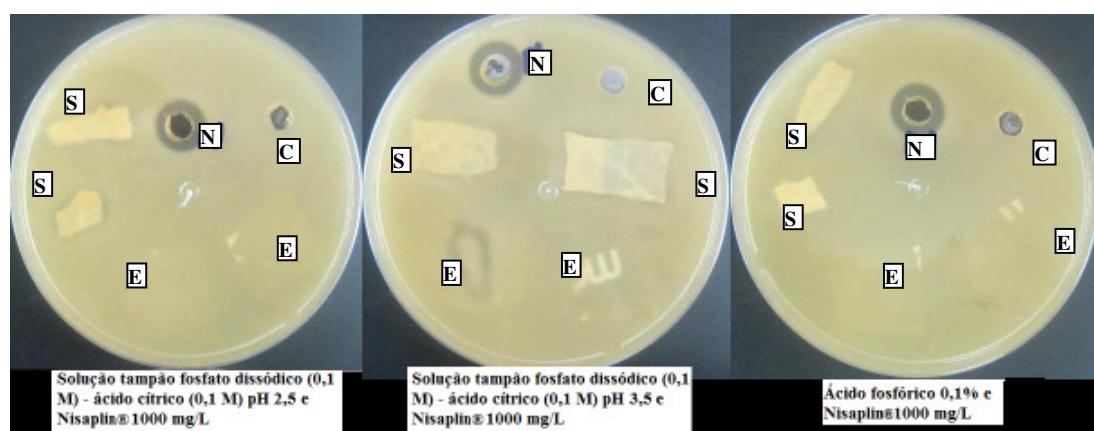
**Tabela 8** – Resultados obtidos a partir do teste de difusão em ágar de tripa suína hidratada (com nisina), envoltório hidratado (com nisina) e solução de hidratação (com e sem nisina) considerando diferentes diluentes e pH

Diluente	pH	Medida dos halos de inibição (mm)			
		Solução	Tripa Natural		Envoltório Celulósico
			C	N	
Ácido fosfórico 0,1%	2,0±0,3	0	3,2 <sup>aABC</sup> ±0,5	0,4 <sup>bB</sup> ±0,2	0
Tampão pH 2,5	2,5	0	2,8 <sup>aA</sup> ±0,8	0,5 <sup>bAB</sup> ±0,5	0
Tampão pH 3,5	3,5	0	2,8 <sup>aA</sup> ±0,5	0,3 <sup>bB</sup> ±0,3	0
Tampão pH 4,5	4,5	0	3,2 <sup>aB</sup> ±0,3	0,4 <sup>bBD</sup> ±0,5	2,2 <sup>cB</sup> ±0,7
Tampão pH 6,0	6,0	0	3,6 <sup>aB</sup> ±0,9	1,1 <sup>bC</sup> ±0,8	2,4 <sup>cB</sup> ±0,7
Tampão pH 7,0	7,0	0	2,9 <sup>aC</sup> ±0,6	0,5 <sup>bBD</sup> ±0,5	0,6 <sup>bC</sup> ±0,5
Tampão pH 8,0	8,0	0	2,9 <sup>aC</sup> ±0,3	0,6 <sup>bAD</sup> ±0,3	0,4 <sup>bD</sup> ±0,1
Tampão pH 9,0	9,0	0	2,3 <sup>aD</sup> ±0,3	0,5 <sup>bBD</sup> ±0,4	0,4 <sup>bCD</sup> ±0,3
Água Deionizada	6,1±0,1	0	3,4 <sup>aB</sup> ±0,5	1,0 <sup>bC</sup> ±0,3	2,3 <sup>cB</sup> ±0,4

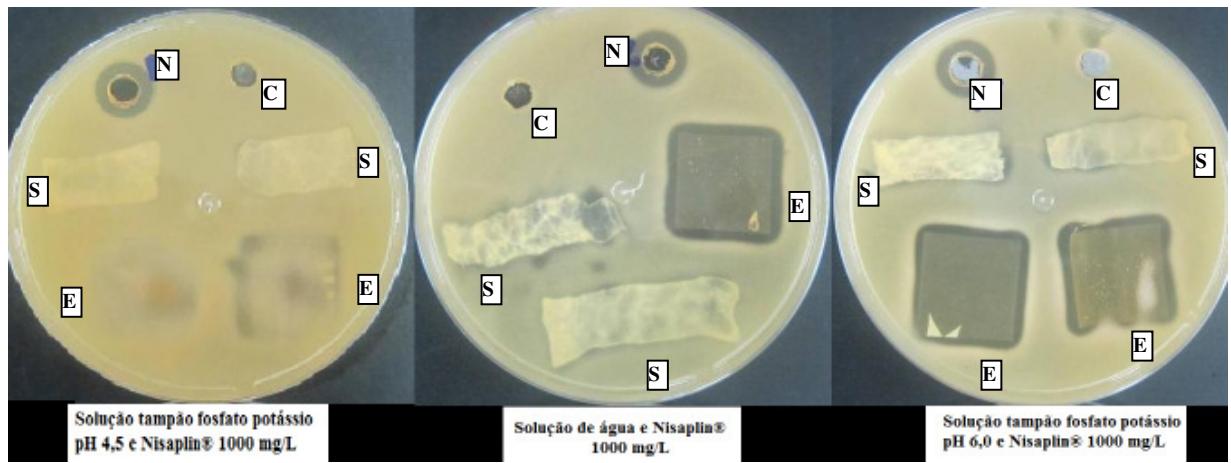
C – controle, N – com 1000 mg/L de Nisaplin®.

a, b, c médias com letras diferentes na mesma linha, apresentam diferença significativa ( $p<0,05$ ).

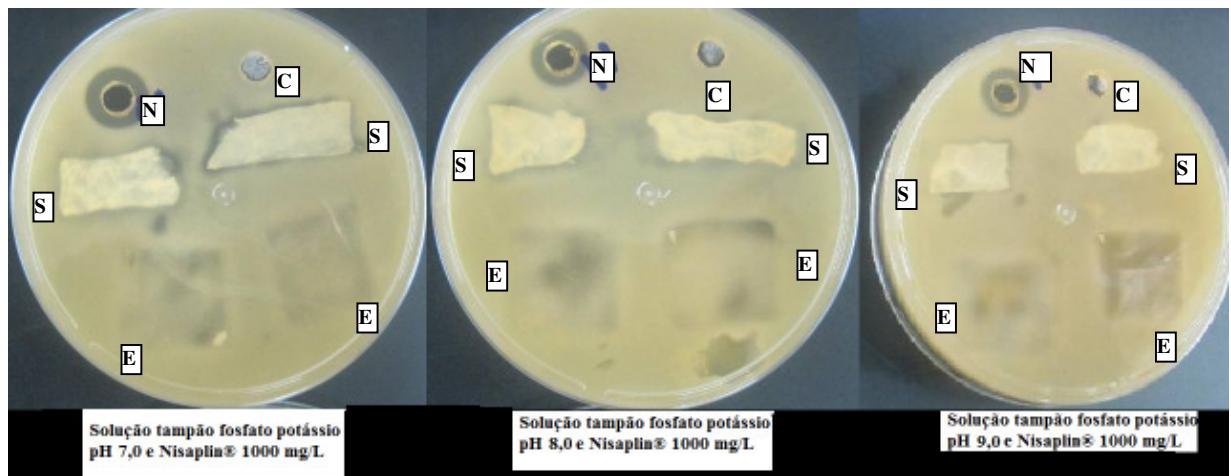
A,B, C, D médias com letras diferentes na mesma coluna, apresentam diferença significativa ( $p<0,05$ ).



**Figura 7** - Teste de difusão em ágar de envoltórios celulósicos (E) e tripas natural suína (S) hidratados (testados em duplicata) em solução de Nisaplin® (1000 mg/L) e tampão pH 2,5; 3,5 ou ácido fosfórico 0,1%. Poços contendo as soluções de hidratação (N) com e (C) sem nisina.



**Figura 8** - Teste de difusão em ágar de envoltórios celulósicos (a) e tripas natural suína (b) hidratados (testados em duplicata) em solução de Nisaplin® (1000 mg/L) e tampão pH 4,5; 6,5 ou em água destilada. Poços contendo as soluções de hidratação (E) com nisin (N) e (C) sem nisin.



**Figura 9** - Teste de difusão em ágar de envoltório celulósico (E) e tripas natural suína (S) hidratados (testados em duplicata) em solução de Nisaplin® (1000 mg/L) e tampão fosfato de potássio pH 7,0;8,0 ou 9,0. Poços contendo as soluções de hidratação (N) com nisin e (C) sem nisin.

#### 4.1.5 Avaliação da atividade antimicrobiana remanescente na solução de hidratação

A Tabela 9 apresenta os resultados da atividade antimicrobiana remanescente na solução hidratação de envoltório celulósico, tripa natural suína e da solução de hidratação (sem contato com a tripa natural ou envoltório celulósico). Verificou-se que para o pH 4,5 a menor atividade remanescente foi observada na tripa suína. No pH 7,0 a tripa natural suína e envoltório celulósico apresentaram atividade remanescente menor que a solução de hidratação. No pH 6,0, a tripa natural, envoltório celulósico e solução de hidratação apresentaram a mesma atividade remanescente.

**Tabela 9** – Resultado obtido para a determinação da atividade antimicrobiana (UA/mL) da solução de Nisaplin® (1000 mg/L) em tampão fosfato com diferentes valores de pH e da mesma solução após a hidratação do envoltório celulósico e da tripa natural suína

pH	Atividade da solução (UA/mL)	Atividade residual da solução de hidratação do envoltório celulósico (UA/mL)	Atividade residual da solução de hidratação da tripa natural (UA/mL)
4,5	40	40	20
6,0	20	20	20
7,0	40	20	20

#### **4.2 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ENVOLTÓRIO CELULÓSICO HIDRATADO EM SOLUÇÃO DE NISAPLIN® EM ÁCIDO FOSFÓRICO 0,1%, APLICADO À MORTADELA.**

##### **4.2.1 Resultados físico-químicos**

Com o objetivo de caracterizar o produto avaliado, foram realizadas análises físico-químicas nas mortadelas produzidas de acordo com os tratamentos A (15% de CMS) e B (10% de CMS) no primeiro dia de armazenamento, para os três lotes avaliados.

Os resultados de umidade, gordura e carboidratos atenderam à Instrução Normativa nº4 (BRASIL, 2000), que estabelece máximo de 65,0%, 30,0% e 10,0%, respectivamente. O produto, no entanto, apresentou proteína abaixo do limite mínimo estabelecido de 12,0% (Tabela 10).

O alto valor de atividade de água (média de 0,975) e pH acima de 4,5 (em torno de 6,5) são característicos do produto que em conjunto, tornam o alimento altamente suscetível ao desenvolvimento de microrganismos, sendo sua conservação alcançada pelo emprego de tratamentos combinados, como processamento térmico, uso de aditivos e embalagem a vácuo.

A gordura da amostra A, com maior teor de CMS, foi significativamente maior que da amostra B. Resultado esperado, uma vez que o CMS empregado na formulação da mortadela apresentava especificação de gordura de 20,0% e as carnes suínas adicionadas 15,0%.

**Tabela 10** – Resultados físico-químicos (média e desvio padrão de três lotes) das amostras de mortadela A (15% de CMS) e B (10% de CMS) com 1 dia de armazenamento

Tratamento	Média±desvio padrão						
	Umidade (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)	Carboidratos (%)	pH	Aw
A	61,4 <sup>a</sup> ±0,5	17,4 <sup>a</sup> ±0,1	11,2 <sup>a</sup> ±0,0	4,0 <sup>a</sup> ±0,1	6,0	6,5 <sup>a</sup> ±0,1	0,975 <sup>a</sup> ±0,002
B	63,1 <sup>a</sup> ±0,4	13,5 <sup>b</sup> ±0,0	11,6 <sup>a</sup> ±0,2	4,2 <sup>a</sup> ±0,1	7,6	6,4 <sup>a</sup> ±0,1	0,975 <sup>a</sup> ±0,001

a, b Médias com letras diferentes na mesma coluna, apresentam diferença significativa ( $p<0,05$ ).

#### 4.2.2 Resultados microbiológicos ao longo da vida-de-prateleira do produto

As Tabelas 21 a 32 (Anexo A) apresentam os resultados microbiológicos (contagem total de bactérias mesófilas aeróbias e contagem de BAL) determinadas a partir de amostras obtidas da superfície e do centro das pelas de mortadela, para os 18 ensaios realizados, individualmente, durante os 60 dias de armazenamento.

Os resultados da contagem total de bactérias mesófilas aeróbias (média e desvio padrão dos três lotes de mortadela) durante o armazenamento estão apresentados nas Tabelas 11 e 12, para amostragens realizadas no centro e na superfície das peças respectivamente.

Os resultados da contagem total de BAL (média e desvio padrão dos três lotes de mortadela) durante o armazenamento estão apresentados nas Tabelas 13 e 14, para amostragens realizadas no centro e na superfície das peças, respectivamente.

**Tabela 11** - Contagem total de bactérias mesófilas aeróbias (média e desvio padrão de três lotes) em amostras retiradas do centro da peça de mortadela, produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Tratamento		log UFC/g (média±desvio padrão)				
Nisaplin® (mg/L)	CMS (%)	Tempo (dias)				
		1	15	30	45	60
0	15	<1,0	2,0±1,4	2,5±0,6	3,8±0,8	3,4±0,2
600	15	1,7±0,8	2,5±1,1	2,4±1,1	3,1±0,6	3,5±0,7
1000	15	<1,0	<1,0	2,2±1,1	4,2±0,6	3,5±0,1
0	10	<1,0	1,4±0,4	3,0±0,1	3,0±0,5	3,5±0,6
600	10	<1,0	<1,0	2,0±0,9	3,2±1,0	3,6±0,6
1000	10	<1,0	1,3±1,2	2,2±0,6	3,3±0,1	3,4±0,4

CMS: carne mecanicamente separada.

**Tabela 12** - Contagem total de bactérias mesófilas aeróbias (média e desvio padrão de três lotes) em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela, produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Tratamento		log UFC/g (média±desvio padrão)				
Nisaplin® (mg/L)	CMS (%)	Tempo (dias)				
		1	15	30	45	60
0	15	<1,00	2,2±0,3	2,8±0,5	4,1±0,3	4,7±0,3
600	15	<1,00	3,1±1,0	3,0±1,8	3,9±0,4	4,4±0,9
1000	15	<1,00	1,3±0,5	3,0±0,7	4,0±0,5	4,2±0,3
0	10	1,2±0,3	2,0±0,5	3,4±0,2	4,5±0,6	4,2±0,5
600	10	<1,00	2,1±1,3	2,9±0,9	3,9±0,2	4,8±0,9
1000	10	<1,00	2,3±0,8	3,6±1,2	4,0±0,2	5,4±0,4

CMS: carne mecanicamente separada.

**Tabela 13** - Contagem de bactérias láticas (média e desvio padrão de três lotes) em amostras retiradas do centro da peça de mortadela, produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Tratamento		log UFC/g (média±desvio padrão)				
Nisaplin® (mg/L)	CMS (%)	Tempo (dias)				
		1	15	30	45	60
0	15	<1,0	2,1±1,9	2,4±0,9	3,1±0,2	3,1±0,5
600	15	<1,0	1,8±1,7	2,3±1,2	3,3±0,7	3,4±1,1
1000	15	1,0	<1,0	2,5±0,5	2,8±1,0	3,2±1,2
0	10	<1,0	1,4±1,2	2,8±0,3	2,6±0,7	3,4±1,0
600	10	<1,0	<1,0	2,2±0,5	3,1±0,8	3,9±1,0
1000	10	<1,0	2,6±0,1	2,2±0,8	3,8±0,8	3,7±0,6

CMS: carne mecanicamente separada.

**Tabela 14** - Contagem de bactérias láticas (média e desvio padrão de três lotes) em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela, produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Tratamento		log UFC/g (média±desvio padrão)				
Nisaplin® (mg/L)	CMS (%)	Tempo (dias)				
		1	15	30	45	60
0	15	<1,0	1,9±1,8	2,8±1,0	4,7±0,4	4,9±0,7
600	15	1,0±0,9	2,4±2,1	2,8±1,1	3,9±0,3	4,8±0,9
1000	15	1,7±0,8	0,9±1,6	2,8±1,1	4,2±0,3	4,2±0,9
0	10	1,2±1,1	1,7±0,8	3,0±0,5	4,1±0,3	5,9±0,3
600	10	1,2±1,1	1,5±1,7	2,9±0,8	3,9±0,4	5,0±1,1
1000	10	1,1±0,9	2,6±0,7	3,5±0,4	3,9±0,6	5,3±0,3

CMS: carne mecanicamente separada.

As Tabelas 15 e 16 apresentam os resultados da ANOVA para a contagem bactérias mesófilas aeróbias e BAL respectivamente. Os termos com p-valor < 0,05 foram considerados de influência significativa sobre a variável resposta.

**Tabela 15** - Análise de variância para a contagem de bactérias mesófilas aeróbias na mortadela

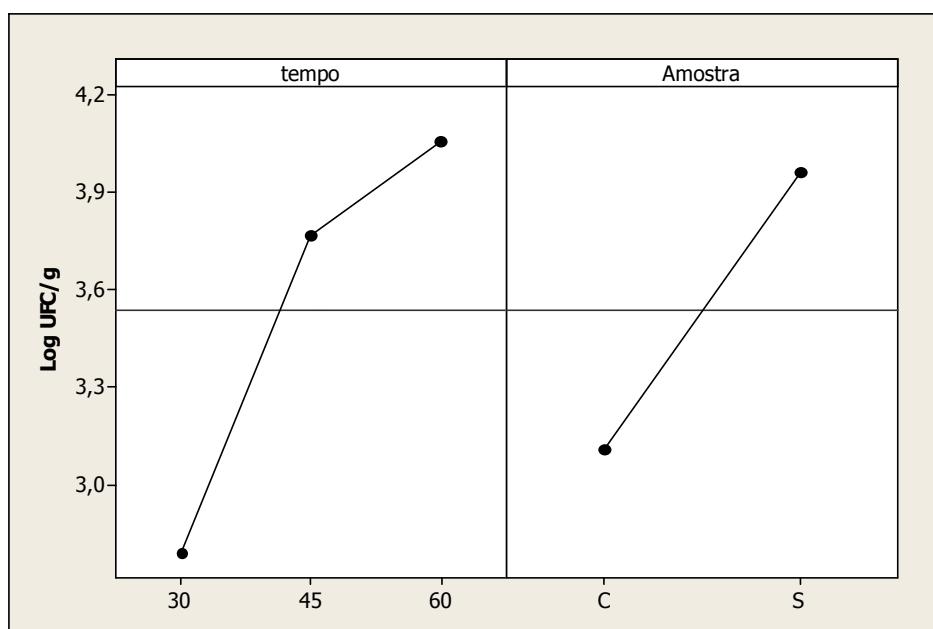
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	p-valor
Conc. Nisaplin®	0,65	2	0,32	0,468
CMS	0,05	1	0,05	0,731
Blocos	1,08	2	0,54	0,283
Tempo	31,54	2	15,77	0,000
Amostragem	19,63	1	19,63	0,000
Conc. Nisaplin® * CMS	0,12	2	0,06	0,866
Conc. Nisaplin® * Tempo	0,90	4	0,22	0,712
CMS * Tempo	0,65	2	0,33	0,465
Conc. Nisaplin® * Amostra	0,10	2	0,05	0,893
CMS * Amostra	1,12	1	1,12	0,107
Tempo * Amostra	36,30	2	0,60	0,246
Resíduo	93,35	86	0,42	-
Total	185,49	107	-	-

\*SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; GL: graus de liberdade.

De acordo com os resultados da Tabela 15, apenas o tempo de armazenamento e a amostragem influenciaram significativamente ( $p<0,05$ ) a contagem de bactérias mesófilas aeróbias

na mortadela. A adição de nisina em combinação com ácido fosfórico 0,1% ao envoltório não apresentou efeito significativo ( $p > 0,05$ ) no controle de bactérias mesófilas aeróbias na mortadela. Estes resultados diferem dos resultados obtidos por Barros *et al.* (2010) que verificaram que a combinação de ácido fosfórico 0,1% e 200 mg/L de nisina aplicada à tripa natural de salsicha estocada em temperatura de 4 °C apresentou um efeito sinergístico capaz de reduzir as contagens de bactérias mesófilas aeróbias e BAL, especialmente nos pontos 14, 28 e 56 dias de estocagem. Em nosso estudo, a tripa suína, como observado na Tabela 8, apresentou atividade antimicrobiana em toda a faixa de pH estudada, mesmo em pH 2,0.

Observa-se na Figura 10 que durante a estocagem da mortadela a população de bactérias mesófilas aeróbias aumentou em média, de 2,8 para 4,1 log UFC/g no período de 30 a 60 dias de armazenamento. Verifica-se também que as contagens na superfície das peças de mortadela são em média 0,9 log UFC/g mais elevados em comparação ao centro da mortadela. Este resultado era esperado, uma vez que as formas de deterioração da mortadela são: produção de gases logo abaixo do envoltório, proteólise promovendo amolecimento principalmente das extremidades da peça e limosidade superficial, indicando uma maior velocidade de multiplicação microbiana, logo abaixo do envoltório.



**Figura 10** - Contagem de bactérias mesófilas aeróbias log UFC/g na mortadela, média de três blocos, em função do tempo de armazenamento (dias) e amostragem (Centro, C e Superfície, S).

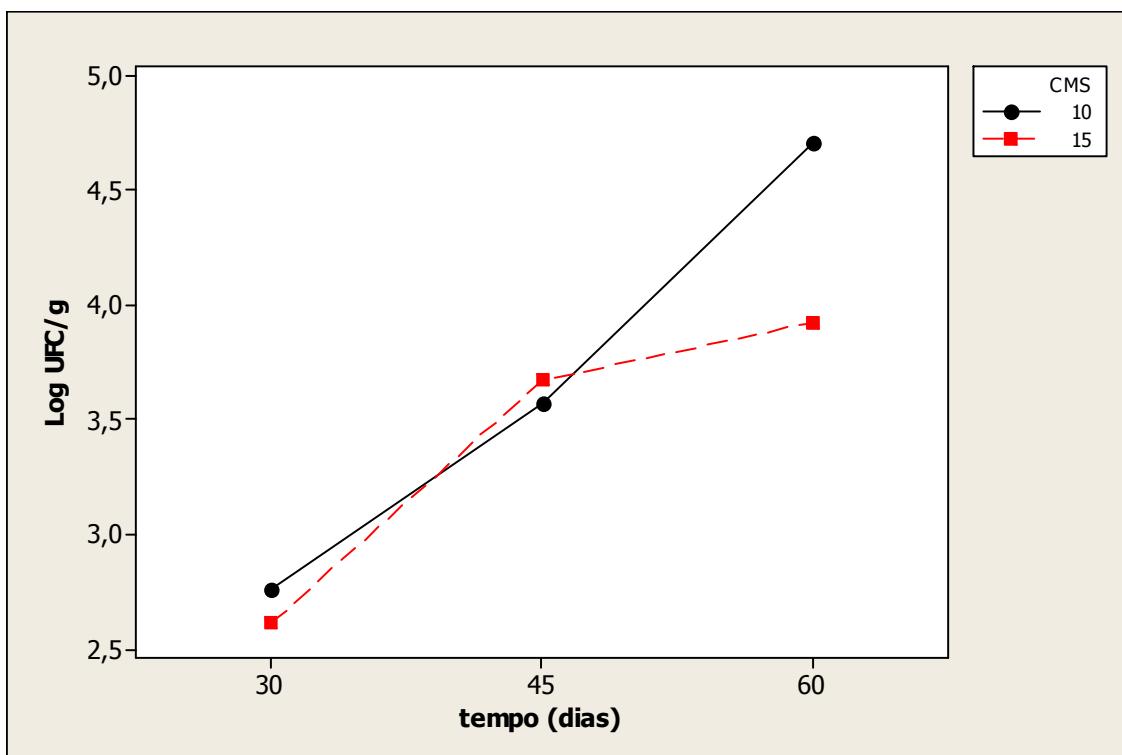
De acordo com o resultado da análise de variância (Tabela 16), a concentração de CMS, o tempo de armazenamento, a amostragem e os blocos apresentaram influência significativa ( $p<0,05$ ) na contagem de BAL na mortadela. Foi verificada também uma interação significativa entre a concentração de CMS e o tempo de armazenamento e entre a amostragem e o tempo de armazenamento. Este resultado mostra que a adição de nisina no envoltório de celulose não influenciou significativamente ( $p > 0,05$ ) a contagem de bactérias láticas no centro e na superfície da mortadela.

**Tabela 16** - Análise de variância para a contagem de bactérias láticas na mortadela

<b>Fonte de variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>p-valor</b>
Conc. Nisaplin®	0,33	2	0,17	0,694
CMS	2,13	1	2,13	0,032
Blocos	5,40	2	2,70	0,004
Tempo	48,37	2	24,18	0,000
Amostragem	29,73	1	29,73	0,000
Conc. Nisaplin® * CMS	0,37	2	0,19	0,664
Conc. Nisaplin® * Tempo	0,91	4	0,23	0,730
CMS * Tempo	3,74	2	1,87	0,019
Conc. Nisaplin® * Amostra	0,56	2	0,28	0,538
CMS *Amostra	0,07	1	0,07	0,687
Tempo *Amostra	4,56	2	2,28	0,008
Resíduo	38,69	86	0,45	-
Total	134,86	107	-	-

\*SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; GL: graus de liberdade.

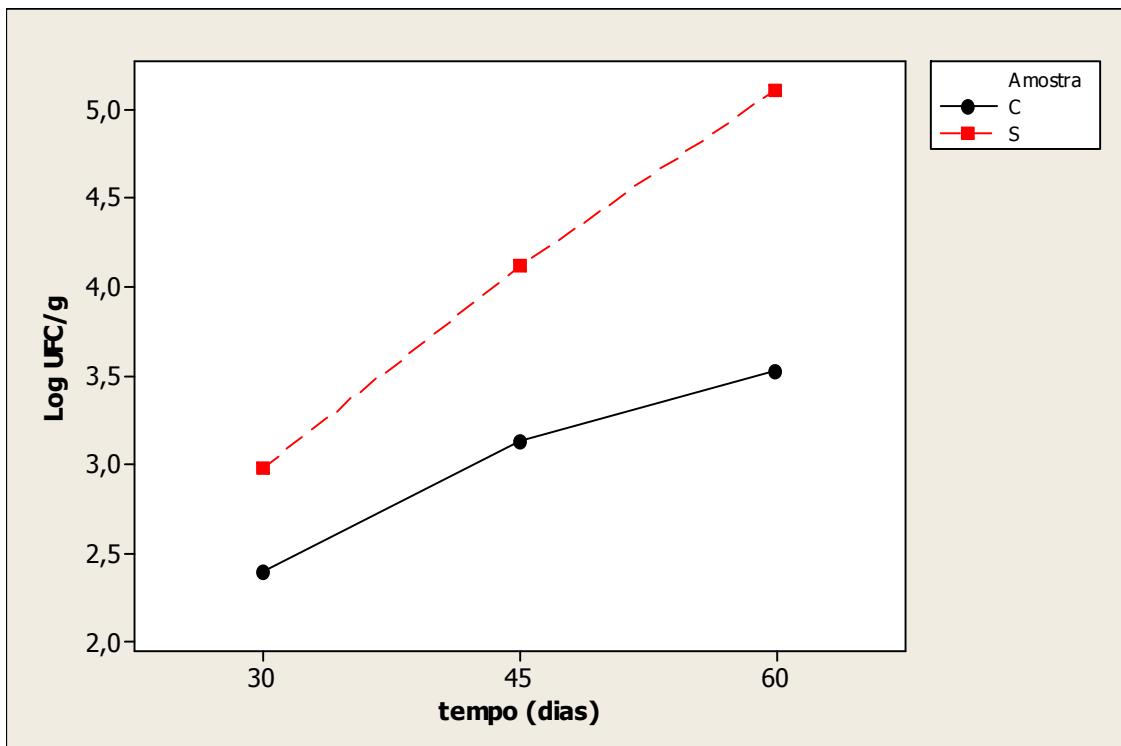
A interação entre a concentração de CMS e o tempo de armazenamento pode ser observada na Figura 11. Até 45 dias de armazenamento a contagem de BAL não diferiu entre as formulações. Em 60 dias de armazenamento, no entanto, a formulação A, com 15% de CMS, apresentou contagens em média 0,8 log UFC/g menores, indicando uma menor multiplicação microbiana nesta formulação. Uma possível explicação seria uma desaceleração na multiplicação microbiana ao longo do tempo de estocagem, ocasionada pela menor disponibilidade de nutrientes como carboidratos e proteínas em virtude do maior teor de gordura presente nesta formulação.



**Figura 11** - Interação entre concentração de CMS e tempo de armazenamento para a contagem de bactérias lácticas nos três lotes de mortadela avaliados.

Na Figura 12, verificam-se contagens mais elevadas de BAL na superfície em relação ao centro das mortadelas em todo o período de armazenamento, tornando-se mais evidente ao final do tempo de estocagem. Entre 30 e 60 dias de armazenamento a população de BAL aumentou em média 1,1 log UFC/g no centro da mortadela, enquanto na superfície tal incremento foi de 2,1 log UFC/g. Ainda que em pequena quantidade, o oxigênio remanescente na embalagem é consumido pela atividade metabólica das bactérias deteriorantes oriundas do ambiente e de manipulação pós-

processo térmico, permitindo a formação de um microssistema anaeróbio/microaeróbio circundando o produto, o qual favorece a multiplicação principalmente das BAL capazes de causar as formas de deterioração descritas acima (SARANTÓPOULOS e OLIVEIRA, 1994; FARIA *et al.*, 2001; SARMENTO, 2006).



**Figura 12** - Interação entre amostragem e tempo de armazenamento para a contagem de BAL nos três lotes de mortadela avaliados (C: centro; S: superfície).

#### 4.3 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ENVOLTÓRIO CELULÓSICO DO PRODUTO HIDRATADO EM SOLUÇÃO DE NISAPLIN® E TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO PH 6,0, APLICADO À MORTADELA.

##### 4.3.1 Resultados físico-químicos da mortadela

Os resultados de umidade, proteína, gordura e carboidratos da mortadela (média de três lotes) com um dia de vida-de-prateleira (Tabela 17) estão de acordo com os limites estabelecidos pela Instrução Normativa nº4 (BRASIL, 2000).

**Tabela 17** – Resultados físico-químicos da mortadela, 1 dia após sua produção (média e desvio padrão de três lotes avaliados)

<b>Média±desvio padrão</b>						
<b>Umidade (%)</b>	<b>Gordura (%)</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Cinzas (%)</b>	<b>Carboidratos (%)</b>	<b>pH</b>	<b>Aw</b>
60,0±0,6	17,1±0,2	13,5±0,3	4,2±0,1	5,2	6,4±0,1	0,962±0,004

#### 4.3.2 Resultados microbiológicos ao longo da vida-de-prateleira da mortadela

As Tabelas 33 a 38 (Anexo B) apresentam os resultados microbiológicos (contagem total de bactérias mesófilas aeróbias e contagem de BAL) para os 6 ensaios realizados, individualmente, durante o período de armazenamento. Os resultados da contagem total de bactérias mesófilas aeróbias e BAL (média e desvio padrão dos três lotes de mortadela avaliados) durante o armazenamento estão apresentados na Tabela 18.

**Tabela 18** - Contagem total de bactérias mesófilas aeróbias e bactérias láticas (média e desvio padrão de três réplicas), obtidas a partir de amostras coletadas da superfície de mortadela embutida em envoltório celulósico, hidratado com solução tampão fosfato pH 6,0 (com e sem nisina)

<b>Tempo (dias)</b>	<b>log UFC/g (média±desvio padrão)</b>			
	<b>Bactérias mesófilas aeróbias</b>		<b>Bactérias láticas</b>	
	<b>C</b>	<b>N</b>	<b>C</b>	<b>N</b>
1	1,9 ± 0,5	2,4 ± 0,7	1,0 ± 0,0	1,9 ± 1,1
15	6,6 ± 0,4	4,4 ± 1,6	6,2 ± 0,2	4,0 ± 1,6
30	6,8 ± 0,9	4,9 ± 0,9	6,5 ± 0,7	4,8 ± 0,7
40	6,7 ± 1,8	3,7 ± 0,6	6,9 ± 1,5	3,5 ± 0,3
50	6,5 ± 2,0	2,8 ± 0,1	5,9 ± 2,8	2,4 ± 0,3

C – controle, N – 1000 mg/L de Nisaplin®

De acordo com as Tabelas 19 e 20, o tratamento com nisina reduziu significativamente as contagens de bactérias mesófilas aeróbias e BAL ao longo do tempo de estocagem do produto.

**Tabela 19** – Análise de Variância (ANOVA) para a contagem de bactérias mesófilas aeróbias na mortadela

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	p-valor
Nisaplin®	16,3	1	14,3	0,003
tempo	48,8	4	11,3	0,001
Blocos	8,0	2	1,9	0,210
Nisaplin® × tempo	9,4	4	2,4	0,128
Resíduo	12,8	12	1,1	
Total	95,3	23	-	-

\*SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; GL: graus de liberdade.

**Tabela 20** – Análise de Variância (ANOVA) para a contagem de bactérias láticas na mortadela

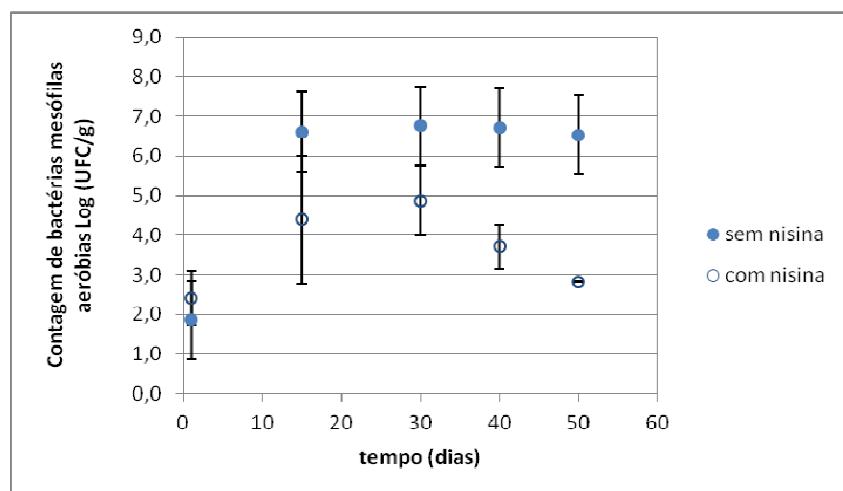
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	p-valor
Nisaplin®	14,3	1	17,7	0,002
tempo	63,1	4	15,9	0,000
Blocos	9,6	2	3,5	0,076
Nisaplin® × tempo	14,0	4	3,5	0,052
Resíduo	13,1	12	1,1	
Total	114,1	23	-	-

\*SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; GL: graus de liberdade.

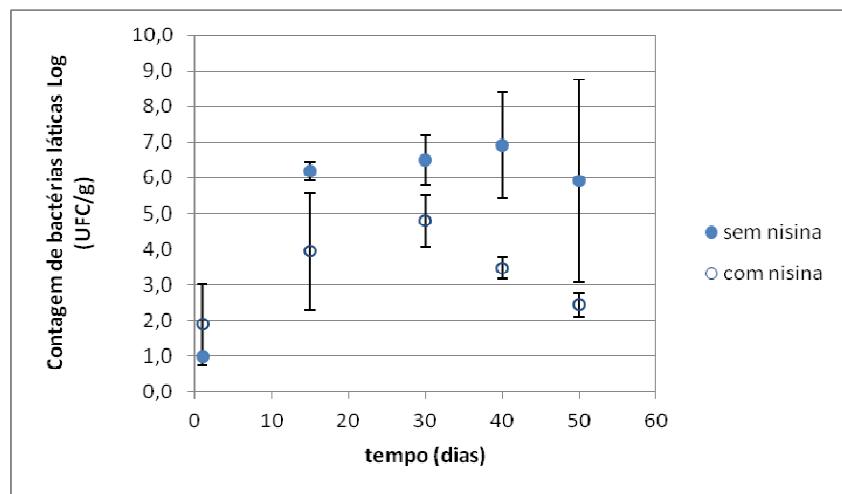
Nas Figuras 13 e 14 é possível verificar a atividade antimicrobiana da nisina sobre a mortadela. Em todos os pontos analisados, com exceção do primeiro dia, verificou-se uma redução nas contagens do tratamento com nisina com relação ao controle, sendo que a partir do 15º dia a diferença foi de 2,0 a 3,5 log UFC/g entre um tratamento e outro. Guerra *et al.* (2005) também observaram uma diferença significativa de aproximadamente 1 log UFC/g na contagem de bactérias mesófilas aeróbias, ao longo da vida-de-prateleira de carne de vitelo embalada com filme celofane

tratado com nisina e solução tampão fosfato pH 6,0 mantida a 4 °C, em relação ao tratamento controle.

Ao longo da vida-de-prateleira, a matriz do alimento tende a entrar em equilíbrio com a embalagem, ocorrendo a migração/difusão de componentes (água, gordura, compostos voláteis), desta forma, espera-se que a dessorção da nisina também seja favorecida pelo tempo de estocagem de produto, o que justificaria o aumento da atividade antimicrobiana da nisina ao longo da vida-de-prateleira da mortadela. Resultado similar foi encontrado por Scannell *et al.* (2000) ao verificar que a presença do filme de base celulósica, tratado com nisina, teve pouco efeito sobre as contagens de BAL na primeira semana, porém a partir deste ponto, as contagens decresceram significativamente, resultando em uma população final praticamente igual à inicial, ao final de 24 dias de estocagem.



**Figura 13** - Contagem total de bactérias mesófilas aeróbias em superfície de mortadela embutida em envoltório de celulose hidratado com solução de Nisaplin® (1000 mg/L) em tampão fosfato pH 6,0 e no controle (sem Nisaplin®).



**Figura 14** - Contagem de bactérias láticas em superfície de mortadela embutida em envoltório de celulose hidratado com solução de Nisaplin® (1000 mg/L) em tampão fosfato pH 6,0 e no controle (sem Nisaplin®).

## 5. CONCLUSÕES

A nisina aplicada ao envoltório não apresentou atividade antimicrobiana quando combinada com os diluentes ácido acético 2,5%, ácido lático 2,5% e ácido fosfórico 0,1%. A maior adsorção de nisina foi verificada nas soluções de pH 4,5; 6,0 e água deionizada. O envoltório celulósico apresentou maior atividade antimicrobiana quando hidratado em solução (1000 mg/L) de Nisaplin® em solução tampão fosfato de potássio pH 6,0 na temperatura de 40 °C por 12 horas.

A adição de nisina no envoltório de celulose, quando incorporada em solução de ácido fosfórico 0,1%, não diferiu significativamente ( $p>0,05$ ) em relação às populações de bactérias mesófilas aeróbias e BAL na mortadela em relação ao controle.

A maior população de bactérias mesófilas e BAL foi verificada na superfície das peças de mortadela com uma diferença de cerca de 1 log UFC/g em relação ao controle.

A maior concentração de CMS (15%), após 45 dias de estocagem inibiu em aproximadamente 1 log UFC/g as BAL em relação à menor concentração de CMS.

A incorporação de nisina no envoltório celulósico pela hidratação em solução de Nisaplin® em tampão fosfato pH 6,0, reduziu significativamente as populações de bactérias mesófilas aeróbias e BAL em mortadela durante o armazenamento ao longo do tempo de estocagem. A partir do 30º dia, a diferença foi de 3,5 log UFC/g entre o produto adicionado ou não de nisina.

Pelo resultado observado, é razoável supor que o uso de nisina e solução tampão fosfato de potássio pH 6,0 no envoltório celulósico é capaz de reduzir as populações de bactérias deteriorantes, podendo ser uma alternativa para o aumento da vida-de-prateleira da mortadela.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, J. M.; GEORNARAS, I. BYELASHOV, O. A. BELK, K. E., SMITH, G. C.; SOFOS, J. N. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in meat product brines containing antimicrobials. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 7, p. M478-M485, 2011.

ALCANTARA, M.; MORAIS, I. C. L.; MATOS, C.; SOUZA, O. C. C. Principais microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 6, n. 1, p. 1-36, 2012.

ARAUZ, L. J.; JOZALA, A. F.; MAZZOLA, P. G.; PENNA, T. C. V. Nisin: biotechnological, production and application: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, p. 146-154, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16.ed., Washington DC, 1995.

BARRETTO, A. C. S. **Efeito da adição de fibras como substituto de gordura em mortadelas**. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, 163p.; 2007.

BARROS, J. R. **Aplicação de nisina em tripa natural para o controle de microrganismos deteriorantes em salsicha**. Dissertação de mestrado. Instituto Mauá de Tecnologia, 61p. 2009.

BARROS, J. R.; KUNIGK, L.; JURKIEWICZ, C. H.; Incorporation of nisin in natural casing for the control of spoilage microorganisms in vaccum packaged sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1001-1008, 2010.

BEUCHAT, L. R.; CLAVERO, M. R.; JAQUETTE, C. B. Effects of nisin and temperature on survival, growth and enterotoxin production characteristics of psychrotrophic *Bacillus cereus* in beef gravy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p.1953, 1997.

BÍSCOLA, V. **Influência da matriz alimentar no efeito antimicrobiano de óleo essencial de orégano e nisina contra *Listeria monocytogenes*: avaliação em modelos cárneos**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, 74p.; 2007.

BORTOLUZZI, R. C. **Aplicação de fibra obtida da polpa de laranja na elaboração de mortadela de frango.** Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, 83p.; 2009.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria DETEN/MS nº 29, de 22 de janeiro de 1996. Diário Oficial da União, Poder, de 22 de jan. de 1996. Disponível em:<[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>, acesso em 20 de novembro de 2013.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 10 de jan. 2001. Disponível em:<[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>, acesso em 10 de outubro de 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO. Instrução Normativa N°4, de 31 de março de 2000. Anexo II. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 05 de abr. de 2000. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em: 10 de jul. 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO. Instrução Normativa N°3, de 17 de janeiro de 2000. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 24 de jan. de 2000. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em: 20 de ago. 2013.

BRUNS, R.E.; BARROS NETO, B.; SCARMINIO, J.S.; **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. 401p.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J. NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.

COLAK, H.; HUMPIKYAN, H.; BINGOL, E. B.; AKSU, H. The effect of nisin and bovine lactoferrin on the microbiological quality of turkish-style meatball. **Journal of Food Safety**, v. 28, n. 3, p.355-376, 2008.

CONCEIÇÃO, F. V.E.; GONÇALVES, E. C. B. A. Qualidade físico-química de mortadelas e carnes moídas e conhecimento dos consumidores na conservação destes produtos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 283-290, 2009.

COTTER, P. D.; HILL, C. ROSS, R. P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 777-778, 2005.

CUTTER, C.N.; WILLETT, J.L.; SIRAGUSA, G.R. Improved antimicrobial activity of nisin-incorporated polymer films by formulation change and addition of food grade chelator. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p.325-328, 2001.

DALCANTON, F. **Modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido láticas em condições isotérmicas e não isotérmicas**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, 190p.; 2010.

DAVE, D.; GHALY, A. E. Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: A critical review. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 6, n. 4, p. 486-510, 2011.

DAVIES, E. A.; MILNE, C. F.; BELVIS, H. E.; POTTER, R. W.; HARRIS, J. M.; WILLIAMS, G. C.; THOMAS, L. V.; DELVES-BROUGHTON, J. Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed *Bologna*-type sausage. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 9, p. 1004-1010, 1999.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin as a food preservative. **Food Australia**, v.57, p. 525-527, 2005.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, v. 18, p. 191-208, 2002.

ERCOLINI, D.; FERROCINO, I.; LA STORIA, A.; MAURIELLO, G.; GIGLI, S.; MASI, P.; VILLANI, F. D. Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. **Food Microbiology**, v. 27, p. 137-143, 2010.

FARIA, J. A. F.; FELICIO, P. E.; NEVES, M. A.; ROMANO, M. A. Formação e estabilidade da cor de produtos cárneos Revisão. **Revista Tecnologia de Carnes**, v. 3, n.2, p. 16-22, 2001.

FIELD, D.; CONNOR, P.M.O; COTTER, P.D.; HILL.C.; ROSS, R.P. The generation of nisin variants with enhanced activity against specific Gram-positive pathogens. **Molecular Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 218-230, 2008.

GÁLVEZ, A.; ABRIQUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p. 51-70, 2007.

- GOMES, F. S. **Antagonismo entre leveduras e bactérias láticas na fermentação alcóolica.** Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, 171p.; 2009.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, B. E.; GOMEZ-TREVIÑO, M.; JIMÉNEZ-SALAS, Z. Bacteriocinas de probióticos. **Revista Salud Pública y Nutrición**, v. 4, n. 2, 2003.
- GUERRA, N.P.; MACÍAS, C.L.; AGRASAR, A.T.; CASTRO, L.O. Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin® as biopreservative agent. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 106-110, 2005.
- HERMAN, C.; MAGUNA, F. P.; GARRO, O. A.; CASTRO, E. A. Effect of temperature, pH and NaCl on nisin activity against *Lactobacillus fructivorans*. **The Journal of the Argentine Chemical Society**, v. 97, n.2, p. 11-18, 2009.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Brasileiro come menos arroz com feijão e mais comida industrializada em casa**, 16 de dezembro de 2010. Disponível em:<[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>, acesso em 10 de outubro de 2012.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil/IBGE. **Coordenação de Trabalho e Rendimento – Rio de Janeiro**, 150p., 2011. Disponível em:<[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>, acesso em 20 de agosto de 2013.
- JAY, J. M. **Fermentação e produtos lácteos fermentados.** In: JAY, J.M. Microbiologia de alimentos. 6<sup>a</sup>ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.
- JEEVARATNAM, K.; JAMUNA, M.; BAWA, A. S. Biological preservation of foods-bacteriocins of lactic acid bacteria. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 446-454, 2005.
- JIN, T. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in skim milk and liquid egg white by antimicrobial bottle coating with polylactic acid and nisin. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 2, p.M83-M88, 2010.
- KARAM, L.; JAMA, C.; DHULSTER, P. CHIHIB, N. E. Study of surfaces interactions between peptides, materials and bactéria for setting up antimicrobial surfaces and active food packaging. **Journal of Materials and Environmental Science**, v. 4(5), p. 798-821, 2013.

KIM, D. W.; HONG, Y. G. Ionic strength effect on adsorption of cellobiohydrolases I and II on microcrystalline cellulose. **Biotechnology letters**, v. 22, p. 1337-1342, 2000.

KRUGER, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, 70p.; 2006.

KUO HUE, C. **O Mercado de frios no Brasil: uma estimativa de demanda a partir de um modelo AIDS em três estágios.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Economia – FGV, 61p.; 2011.

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiology Methods**, v. 13, p. 145-150, 1991.

LIU, W.; HANSEN, J. N. Some chemical and physical properties of nisin a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n.8, p. 2551-2558, 1990.

MANGALASSARY, S.; HAN, I.; RIECK, J.; ACTON, J. DAWSON, P. Effects of combining nisin and/or lysozyme with in-package pasteurization for control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat turkey *bologna* during refrigerated storage. **Food Microbiology**, v. 25, n. 7, p.866-870, 2008.

MATARAGAS, M.; DROSINOS, E. H. Shelf life establishment of a sliced, cooked, cured meat product based on quality and safety determinants. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 8, p.1881-1889, 2007.

MAURIELLO, G.; ERCOLINI, D.; LA STORIA, A.; CASABURI, A.; VILLANI, F. Development of polyethylene films for food packaging activated with an antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 314-322, 2004.

MAURIELLO, G.; DE LUCA, E.; LA STORIA, A.; VILLANI, F.; ERCOLINI, D. Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 464-469, 2005.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A. J.; BERKELEY, R. C. W. Methods for studying bacteriocin. **Methods in Microbiology**, v. 7, p. 313-342, 1972.

MELO, N. R.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; LIMA, D. V. Avaliação da eficiência de filme antimicrobiano incorporado com nisina sobre o crescimento de *Staphylococcus* sp. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 17, n. 1, p. 91-95, 2006.

MORTON, R.D. Aerobic Plate Count. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association, p. 63-67, 2001.

NATTRESS, F. M.; BAKER, L. P.; Effects of treatment with lysozyme and nisin on the microflora and sensory properties of commercial pork. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 259-267, 2003.

NEETOO, H.; YE, M. CHEN, H. JOERGER, R. D.; HICKS, D. T.; HOOVER, D. G. Use of nisin-coated plastic films to control *Listeria monocytogenes* on vaccum-packaged cold-smoked salmon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 8-15, 2008.

NES, I. F.; YOON, S. S.; DIEP, D. B. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: A review. **Food Science Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 675-690, 2007.

NGUYEN, V. T.; GIDLEY, M. J.; DYKES, G. A. Potencial of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. **Food Microbiology**, v. 25, p. 471-478, 2008.

PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 521-542, 2007.

PELLICER, K. COPES, J. GIANNUZZI, L. ZARITZKY, N. Behavior of *Listeria monocytogenes* type1 355/98 (85) in meat emulsions as affected by temperature, pH, water activity, fat and microbial preservatives. **Food Control**, v. 22, n. 10, p.1573-1581, 2011.

RAHEEM, D. Application of plastics and paper as food packaging material – an overview. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 25, n. 3, p. 177-188, 2012.

- RAJU, C. V.; SHAMASUNDAR, B. A.; UDUPA, K. S. The use of nisin as a preservative in fish sausage stored at ambient (28±2) °C and refrigerated (6±2) °C temperatures. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38, p. 171-185, 2003.
- REUNANEN, J. SARIS, P. E. J. Bioassay for nisin in sausage; a shelf life study of nisin in cooked sausage. **Meat Science**, v. 66, p. 515-518, 2004.
- REVISTA FI. Shelf life uma pequena introdução. **Food Ingredients Brasil**, v. 18, 2011.
- ROLLEMA, H. S.; KIUPERS, O. P.; BOTH, P.; DE VOS, W. M.; SIEZEN, R. J. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 2873-2878, 1995.
- ROSE, N. L.; PALCIC, M. M.; McMULLEN, L. M. Nisin: a novel substrate for Glutathione S-Transferase isolated from fresh beef. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 6, p. 2288-2293, 2003.
- SAMELIS, J. BEDIA, G. K.; SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SCANGA, J.A.; SMITH, G. C. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4C in vacuum packages. **Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie – Food Science and Technology**, v. 38, p. 21-28, 2005.
- SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M. **Sistemas de embalagens plásticas para preservação de carne bovina e derivados**. In: Ciência e Tecnologia da Carne Bovina. Campinas: CTC/ITAL, p. 58-70, 1994.
- SARMENTO, C. M. P. **Modelagem do crescimento microbiano e avaliação sensorial no estudo da vida-de-prateleira da mortadela e da linguiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, 145p.; 2006.
- SAVADOGO, A.; OUATTARA, C. A. T.; BASSOLE, I. H. M.; TRAORE, S. A. Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n. 9, p. 678-683, 2006.
- SCANNELL, A. G. M.; HILL, C.; ROSS, R. P.; MARX, S.; HARTMEIER, W.; ARENDT, E. K. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin®. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 241-249, 2000.

SCHNEIDER, N.; WERKMEISTER, K.; PISCHETSRIEDER, M. Analysis of nisin A, nisin Z and their degradation products by LCMS/MS. **Food Chemistry**, v. 127, p. 847-854, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVERIA, N. F. A. **Contagem de bactérias lácticas**. In: Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, cap. 13, p. 105-106, 1997.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análises de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 235p.

TERRA, N. N.; BRUM, M. A. R. **Carne e seus derivados: técnicas de controle de qualidade**. São Paulo: Nobel, 1988. 121p.

VIEIRA, A. P. **Aplicação de bacteriocinas de bactérias lácticas para controle de *Listeria monocytogenes* em queijo minas frescal processado pelo método de acidificação direta**. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP, 107p.; 2011.

WANG. F. S. Effects of three preservative agents on the shelf life of vaccum packaged chinese-style sausage stored at 20°C. **Meat Science**, v. 56, p. 67-71, 2000.

WIJNKER, J. J.; WEERTS, E. A. W. S.; BREUKINK, E. J.; Houben, J. H.; LIPMAN, L.J.A. Reduction of *Clostridium sporogenes* spore outgrowth in natural sausage casings using nisin. **Food Microbiology**, v. 28, p. 974-979, 2011.

WISSELINK, H. W.; WEUSTHUIS, R. A.; EGGINK, G.; HUGENHOLTZ, J.; GROBBEN, G. J. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 151-161, 2002.

YANG, R.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Novel method to extract large amount of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3355-3359, 1992.

YUNES, J. F. F. **Avaliação dos efeitos da adição de óleos vegetais como substitutos de gordura animal em mortadela**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, 97p. 2010.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 50-56, 2012.

ZDANSKI, S. F. R. **Ácidos orgânicos e seus sais e nisina no controle de bactérias láticas, aeróbias mesófilas e *Listeria monocytogenes* em salsichas.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, 62 p.; 2011.

**ANEXO A - RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS REALIZADAS DURANTE A VIDA-DE-PRATELEIRA DA MORTADELA (ENVOLTÓRIO CELULÓSICO HIDRATADO EM SOLUÇÃO DE ÁCIDO FOSFÓRICO 0,1%).**

**Tabela 21** - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras retiradas do centro da peça de mortadela (Lote 1), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Nisaplin®(mg/L)	CMS (%)	log UFC/g				
		1	15	30	45	60
0	15	<1,00	1,00	1,85	4,66	3,70
600	15	1,00	1,30	1,30	2,83	3,04
1000	15	<1,00	<1,00	2,56	4,88	3,59
0	10	<1,00	1,85	3,11	3,56	4,08
600	10	<1,00	1,48	2,34	3,76	4,28
1000	10	1,00	1,48	1,85	3,32	3,69

CMS: carne mecanicamente separada.

**Tabela 22** - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela (Lote 1), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Nisaplin®(mg/L)	CMS	log UFC/g				
		1	15	30	45	60
0	15	1,48	1,85	2,43	4,38	4,58
600	15	<1,00	2,04	1,00	3,56	4,83
1000	15	<1,00	1,70	2,51	4,46	4,00
0	10	1,00	1,95	3,46	4,79	4,79
600	10	<1,00	1,70	2,88	4,04	5,81
1000	10	1,30	1,85	2,81	3,86	5,72

CMS: carne mecanicamente separada.

**Tabela 23** - Contagem de bactérias láticas em amostras retiradas do centro da peça de mortadela (Lote 1), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Tratamento		log UFC/g				
Nisaplin®(mg/L)	CMS	Tempo (dias)				
		1	15	30	45	60
0	15	<1,00	<1,00	1,48	2,90	2,48
600	15	<1,00	<1,00	1,30	2,46	2,11
1000	15	<1,00	<1,00	2,94	1,78	1,95
0	10	<1,00	<1,00	2,68	2,28	5,00
600	10	<1,00	<1,00	2,23	3,18	5,00
1000	10	<1,00	2,68	1,30	3,00	4,08

CMS: carne mecanicamente separada.

**Tabela 24** - Contagem de bactérias láticas em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela (Lote 1), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Tratamento		log UFC/g				
Nisaplin®(mg/L)	CMS	Tempo (dias)				
		1	15	30	45	60
0	15	<1,00	<1,00	1,95	4,83	4,04
600	15	<1,00	<1,00	1,48	3,51	3,99
1000	15	1,00	<1,00	2,79	4,28	3,23
0	10	1,85	1,48	2,59	4,83	6,32
600	10	<1,00	<1,00	2,59	3,98	6,15
1000	10	1,48	2,75	3,91	3,23	5,04

CMS: carne mecanicamente separada.

**Tabela 25** - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras retiradas do centro da peça de mortadela (Lote 2), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Nisaplin®(mg/L)	CMS	log UFC/g				
		1	15	30	45	60
0	15	<1,00	3,59	3,00	3,61	3,30
600	15	1,48	3,20	3,48	3,85	4,36
1000	15	<1,00	<1,00	1,00	3,85	3,46
0	10	<1,00	1,00	2,88	2,48	3,36
600	10	<1,00	<1,00	1,00	2,11	3,28
1000	10	<1,00	<1,00	1,85	3,48	2,95

CMS: carne mecanicamente separada.

**Tabela 26** - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela (Lote 2), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Nisaplin®(mg/L)	CMS	log UFC/g				
		1	15	30	45	60
0	15	<1,00	2,32	2,70	4,26	5,00
600	15	<1,00	3,97	3,56	4,28	4,98
1000	15	1,30	1,00	3,81	3,48	4,11
0	10	1,60	1,48	3,20	3,89	4,04
600	10	<1,00	1,00	2,00	3,70	4,23
1000	10	<1,00	1,70	2,95	3,85	4,88

CMS: carne mecanicamente separada.

**Tabela 27** - Contagem de bactérias láticas em amostras retiradas do centro da peça de mortadela (Lote 2), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Tratamento		log UFC/g				
Nisaplin®(mg/L)	CMS	Tempo (dias)				
		1	15	30	45	60
0	15	<1,00	3,54	3,26	3,36	3,18
600	15	<1,00	2,34	3,60	3,70	4,00
1000	15	2,00	2,51	2,00	2,95	3,28
0	10	<1,00	1,85	2,57	2,08	3,79
600	10	<1,00	1,30	1,70	2,28	3,30
1000	10	2,04	2,48	2,46	4,62	3,90

CMS: carne mecanicamente separada.

**Tabela 28** - Contagem de bactérias láticas em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela (Lote 2), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Tratamento		log UFC/g				
Nisaplin®(mg/L)	CMS	Tempo (dias)				
		1	15	30	45	60
0	15	1,30	2,04	2,67	4,23	5,23
600	15	1,48	3,87	3,62	3,95	5,81
1000	15	2,67	2,78	2,70	4,48	5,00
0	10	1,88	1,00	2,95	3,30	5,62
600	10	1,48	1,30	2,30	3,48	5,00
1000	10	1,70	1,78	3,41	4,04	5,36

CMS: carne mecanicamente separada.

**Tabela 29** - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras retiradas do centro da peça de mortadela (Lote 3), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Nisaplin®(mg/L)	CMS	log UFC/g				
		1	15	30	45	60
0	15	1,00	1,48	2,68	3,08	3,36
600	15	2,52	3,11	2,48	2,68	3,11
1000	15	<1,00	<1,00	3,08	3,85	3,48
0	10	1,30	1,30	3,11	3,04	3,00
600	10	1,48	1,00	2,60	3,88	3,18
1000	10	<1,00	2,46	2,80	3,23	3,56

CMS: carne mecanicamente separada.

**Tabela 30** - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela (Lote 3), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Nisaplin®(mg/L)	CMS	log UFC/g				
		1	15	30	45	60
0	15	1,00	2,48	3,36	3,79	4,49
600	15	2,30	3,34	4,46	3,85	3,41
1000	15	1,00	<1,00	2,85	3,95	4,51
0	10	1,00	2,46	3,66	4,96	3,92
600	10	2,49	3,59	3,84	3,97	4,36
1000	10	<1,00	3,23	4,95	4,26	5,49

CMS: carne mecanicamente separada.

**Tabela 31** - Contagem de bactérias láticas em amostras retiradas do centro da peça de mortadela (Lote 3), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Tratamento		log UFC/g				
Nisaplin®(mg/L)	CMS	Tempo (dias)				
		1	15	30	45	60
0	15	1,00	2,76	2,41	3,15	3,56
600	15	2,54	3,20	2,11	3,72	4,08
1000	15	1,00	<1,00	2,56	3,70	4,34
0	10	1,00	2,32	3,15	3,43	3,11
600	10	1,00	1,60	2,62	3,86	3,28
1000	10	<1,00	2,54	2,72	3,88	3,04

CMS: carne mecanicamente separada.

**Tabela 32** - Contagem de bactérias láticas em amostras retiradas da superfície da peça de mortadela (Lote 3), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos (concentração de Nisaplin® aplicado ao envoltório e porcentagem de CMS da formulação do produto)

Tratamento		log UFC/g				
Nisaplin®(mg/L)	CMS	Tempo (dias)				
		1	15	30	45	60
0	15	1,00	3,65	3,86	4,99	5,32
600	15	1,60	3,46	3,30	4,20	4,59
1000	15	1,60	<1,00	2,95	3,85	4,43
0	10	<1,00	2,56	3,54	4,23	5,92
600	10	2,23	3,34	3,83	4,28	4,00
1000	10	<1,00	3,20	3,11	4,36	5,63

CMS: carne mecanicamente separada.

**ANEXO B – TABELAS EXIBINDO OS RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS REALIZADAS DURANTE A VIDA-DE-PRATELEIRA DA MORTADELA (ENVOLTÓRIO CELULÓSICO HIDRATADO EM TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO PH 6,0).**

**Tabela 33** - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras mortadela (Lote 1), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos

<b>Tratamento</b>	<b>log UFC/g</b>				
	<b>Tempo (dias)</b>				
	<b>1</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>
C	1,77	6,87	7,4	7,97	7,96
N	2,48	4,00	5,53	ND	ND

C – controle, N – 1000 mg/L de Nisaplin® ND – Resultado não disponível

**Tabela 34** - Contagem de bactérias láticas em amostras mortadela (Lote 1), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos

<b>Tratamento</b>	<b>log UFC/g</b>				
	<b>Tempo (dias)</b>				
	<b>1</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>
C	1,00	6,35	6,99	7,96	7,94
N	3,18	3,00	5,24	ND	ND

C – controle, N – 1000 mg/L de Nisaplin® ND – Resultado não disponível

**Tabela 35** - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras mortadela (Lote 2), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos

<b>Tratamento</b>	<b>log UFC/g</b>				
	<b>Tempo (dias)</b>				
	<b>1</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>
C	1,42	ND	ND	ND	ND
N	1,70	3,00	5,19	3,32	2,85

C – controle, N – 1000 mg/L de Nisaplin® ND – Resultado não disponível

**Tabela 36** - Contagem de bactérias láticas em amostras mortadela (Lote 2), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos

<b>Tratamento</b>	<b>log UFC/g</b>				
	<b>Tempo (dias)</b>				
	<b>1</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>
C	1,00	6,00	ND	ND	ND
N	1,00	5,85	5,18	3,26	2,68

C – controle, N – 1000 mg/L de Nisaplin® ND – Resultado não disponível

**Tabela 37** - Contagem total de mesófilos aeróbios em amostras mortadela (Lote 3), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos

<b>Tratamento</b>	<b>log UFC/g</b>				
	<b>Tempo (dias)</b>				
	<b>1</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>
C	2,38	6,35	6,13	5,47	5,12
N	3,05	6,18	3,87	4,10	2,79

C – controle, N – 1000 mg/L de Nisaplin® ND – Resultado não disponível

**Tabela 38** - Contagem de bactérias láticas em amostras mortadela (Lote 3), produzidas de acordo com os diferentes tratamentos

<b>Tratamento</b>	<b>log UFC/g</b>				
	<b>Tempo (dias)</b>				
	<b>1</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>
C	1,00	ND	5,99	5,87	3,92
N	1,48	3,00	3,96	3,69	2,21

C – controle, N – 1000 mg/L de Nisaplin® ND – Resultado não disponível