

**JOYCE REGINA DE BARROS**

**APLICAÇÃO DE NISINA EM TRIPA NATURAL PARA O CONTROLE  
DE MICRORGANISMOS DETERIORANTES EM SALSICHA**

**SÃO CAETANO DO SUL  
2009**

**JOYCE REGINA DE BARROS**

**APLICAÇÃO DE NISINA EM TRIPA NATURAL PARA O CONTROLE  
DE MICRORGANISMOS DETERIORANTES EM SALSICHA**

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: Análise e Otimização de  
Processos Industriais.

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

**SÃO CAETANO DO SUL  
2009**

Barros, Joyce Regina de

Aplicação de nisina em tripa natural para o controle de microrganismos deteriorantes em salsicha / Joyce Regina de Barros – São Caetano do Sul, SP: CEUN–EEM, 2009.  
61p.

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação. Linha de Pesquisa: Análise e Otimização de Processos Industriais – Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário de Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP, 2009.

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

1. Nisina 2. Bacteriocina 3.Salsicha 4. Tripa natural I. Barros, Joyce Regina de II. Instituto Mauá de Tecnologia. Centro Universitário III.Título

*Dedico este Trabalho*

*Ao meu marido Rogério*

*Ao meu filho Thiago*

*Aos meus pais João e Célia*

*A minhas irmãs Jussara e Juliana e*

*Minha orientadora Cynthia*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço especialmente a minha orientadora Cynthia por toda a dedicação, paciência e apoio ao longo de toda esta jornada, pois sem seus conhecimentos e ensinamentos, não teria chegado até aqui.*

*Agradeço ao Rogério e Thiago pela paciência e pelo apoio para confecção deste trabalho.*

*A meus pais e irmãos que sempre me incentivaram e estiveram de prontidão para as minhas necessidades.*

*Aos funcionários do laboratório da EEM, principalmente aos técnicos Gláucia, Débora, Rúbio, Sidnei e Douglas.*

*As estagiárias Tânia e Bianca que auxiliaram nos experimentos.*

*As ex-alunas Cristiane e Verônica pelo auxílio na fabricação das salsichas.*

*A Hienast & Kratschmer Ltda. (HRAKI), pelo fornecimento do compacto, da tripa natural e das “dicas” para a fabricação das salsichas.*

*A CRYOBA Sealed Air Corporation, pelo fornecimento das embalagens.*

*A DANISCO pelo fornecimento do nisaplin®.*

*A todos meus amigos e familiares que sempre me apoiaram e me incentivaram.*

## RESUMO

Atualmente os consumidores tem preferido alimentos convenientes e sem adição de conservantes químicos. De forma a aumentar a vida útil e a segurança microbiológica destes produtos, o emprego de bacteriocinas como conservantes naturais tem sido avaliado. Bacteriocinas são peptídeos que apresentam propriedades antimicrobianas sobre espécies de bactérias relacionadas ao microrganismo produtor e podem atuar como ferramentas úteis na redução de patógenos e bactérias deteriorantes nos alimentos. Considerando que a nisina é atualmente a bacteriocina mais utilizada na conservação de alimentos, este trabalho teve como objetivo avaliar sua eficiência, quando aplicada no envoltório de salsicha sobre o crescimento de bactérias láticas e bactérias aeróbias mesófilas. As salsichas foram produzidas em planta piloto, embutidas em tripa natural de ovino e embaladas à vácuo. Três fatores foram avaliados: o diluente utilizado na hidratação da tripa (água e ácido fosfórico 0,1%); a presença de nisina (200 mg/L) na solução de hidratação da tripa e a temperatura de armazenamento das salsichas (4 e 10 °C). Os ensaios foram realizados de acordo com um planejamento fatorial completo  $2^3$ , totalizando 8 experimentos que foram repetidos em 3 blocos. A enumeração de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias láticas foi realizada nos dias 1, 14, 28, 42 e 56 do período de armazenamento. Os resultados mostraram que a hidratação das tripas em ácido fosfórico 0,1% não inibiu o crescimento de bactérias láticas e a ação da nisina é maior quando a temperatura de armazenamento é mais baixa (4 °C), além disso foi verificado uma sinergia entre a nisina e o ácido fosfórico, potencializando sua atividade antimicrobiana, sobre as bactérias láticas. Portanto a aplicação conjunta de nisina e ácido fosfórico na etapa de hidratação da tripa, somado ao armazenamento em baixa temperatura (4°C), são obstáculos que apresentaram potencial no controle do crescimento de bactérias láticas em salsicha.

**PALAVRAS-CHAVE: NISINA. BACTERIOCINA. SALSICHA. TRIPA NATURAL.**

## **ABSTRACT**

In recent years, consumers are demanding for food being more convenient as well as free of chemical additives. In order to increase the shelf life and microbiological safety of these products, the use of bacteriocins as natural preservatives has been assessed. Bacteriocins of lactic acid bacteria are peptides that have antimicrobial properties against bacteria species related to the producer organism. Considering that nisin is currently the bacteriocin most used in the preservation of foods, this study aimed to evaluate its effectiveness when applied to sausage natural casing to control the growth of lactic acid bacteria and total aerobic plate counts. The sausages were produced in a pilot plant, stuffed into natural ovine casing and vacuum packaging. Three factors were evaluated in two levels: 1) the diluent used in casings soaking (water or phosphoric acid solution 0.1%), 2) concentration of nisin in casing soaking solution (0 or 200 mg/L) and 3) the storage temperature of sausages (4 and 10 °C). The experiments were performed according to a full factorial design  $2^3$ , totalizing 8 treatments that were repeated in 3 blocks. Total aerobic counts and lactic acid bacteria analysis were conducted at 1, 14, 28, 42 and 56 days of storage period. The results showed that phosphoric acid 0.1% did not inhibit the growth of lactic acid bacteria. Nisin activity against lactic acid bacteria was enhanced by the addition of phosphoric acid, demonstrating a synergistic effect. Furthermore nisin activity increased in lower storage temperature (4 °C). Therefore natural casing treatment with nisin and phosphoric acid, added to low storage temperature (4°C), are obstacles that present a potential for controlling the growth of lactic acid bacteria in vacuum packaged sausage.

**KEY-WORDS: NISIN. BACTERIOCIN. SAUSAGE. NATURAL CASING.**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	DIAGRAMA DE BLOCOS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA SALSICHA .....	29
FIGURA 2 -	ESQUEMA DE TRATAMENTOS DAS SALSICHAS .....	30
FIGURA 3 -	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NISINA PRESENTE NA TRIPA HIDRATADA COM SOLUÇÃO CONTROLE (A) E EM POÇO COM SOLUÇÃO CONTROLE (B) .....	33
FIGURA 4 -	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NISINA PRESENTE NA TRIPA HIDRATADA COM SOLUÇÃO DE NISAPLIN® 400 mg/L (A) E EM SOLUÇÃO DE MESMA CONCENTRAÇÃO (B) .....	33
FIGURA 5 -	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NISINA PRESENTE NA TRIPA HIDRATADA COM SOLUÇÃO DE NISAPLIN® 600 mg/L (A) E EM SOLUÇÃO DE MESMA CONCENTRAÇÃO (B) .....	34
FIGURA 6 -	EFEITO DA NISINA, SOLUÇÃO DE HIDRATAÇÃO E TEMPERATURA NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS, NAS SALSICHAS NO 14º DIA DE ARMAZENAMENTO .....	40
FIGURA 7 -	EFEITO DA SOLUÇÃO DE HIDRATAÇÃO E DA TEMPERATURA NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS, PARA O 28º DIA DE ARMAZENAMENTO .....	42
FIGURA 8 -	EFEITO DA NISINA, SOLUÇÃO DE HIDRATAÇÃO E TEMPERATURA NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS, NAS SALSICHAS NO 28º DIA DE ARMAZENAMENTO .....	43
FIGURA 9 -	EFEITO DA SOLUÇÃO DE HIDRATAÇÃO E DA TEMPERATURA NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS, PARA O 56º DIA DE ARMAZENAMENTO .....	47
FIGURA 10 -	EFEITO DA NISINA, SOLUÇÃO DE HIDRATAÇÃO E TEMPERATURA NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS, NAS SALSICHAS NO 56º DIA DE ARMAZENAMENTO .....	48
FIGURA 11 -	INFLUÊNCIA MÉDIA DA TEMPERATURA NOS 8 TRATAMENTOS DURANTE O ARMAZENAMENTO DAS SALSICHAS NA POPULAÇÃO DE: A) BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS E B) BACTÉRIAS LÁTICAS .....	50
FIGURA 12 -	INFLUÊNCIA DA SOLUÇÃO DE HIDRATAÇÃO NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS, NAS SALSICHAS ARMAZENADAS A 4 °C: A) HIDRATAÇÃO EM ÁGUA B) HIDRATAÇÃO EM ÁCIDO .....	53



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	FORMULAÇÃO DA SALSICHA .....	28
TABELA 2 -	VARIÁVEIS INDEPENDENTES E NÍVEIS ESTUDADOS .....	30
TABELA 3 -	ENSAIOS REALIZADOS DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 <sup>3</sup> .....	30
TABELA 4 -	pH DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NA HIDRATAÇÃO DAS TRIPAS ..	32
TABELA 5 -	ATIVIDADE DE INIBIÇÃO NO TESTE DE DIFUSÃO EM AGAR .....	33
TABELA 6 -	POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS (LOG UFC/g) PRESENTE NAS SALSICHAS PRODUZIDAS NO LOTE I .....	34
TABELA 7 -	POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS (LOG UFC/g) PRESENTE NAS SALSICHAS PRODUZIDAS NO LOTE II .....	35
TABELA 8 -	POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS (LOG UFC/g) PRESENTE NAS SALSICHAS PRODUZIDAS NO LOTE III .....	35
TABELA 9 -	POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS (LOG UFC/g) PRESENTE NAS SALSICHAS PRODUZIDAS NO LOTE I .....	36
TABELA 10 -	POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS (LOG UFC/g) PRESENTE NAS SALSICHAS PRODUZIDAS NO LOTE II .....	36
TABELA 11 -	ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS PARA O 1º DIA DE ARMAZENAMENTO .....	37
TABELA 12 -	ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS PARA O 1º DIA DE ARMAZENAMENTO .....	37
TABELA 13 -	ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS PARA O 14º DIA DE ARMAZENAMENTO ...	38
TABELA 14 -	ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS PARA O 14º DIA DE ARMAZENAMENTO .....	38
TABELA 15 -	ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS PARA O 28º DIA DE ARMAZENAMENTO ...	41
TABELA 16 -	ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS PARA O 28º DIA DE ARMAZENAMENTO .....	41
TABELA 17 -	ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS PARA O 42º DIA DE ARMAZENAMENTO ...	44

TABELA 18 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS PARA O 42º DIA DE ARMAZENAMENTO .....	44
TABELA 19 – ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS PARA O 56º DIA DE ARMAZENAMENTO ...	45
TABELA 20 – ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS PARA O 56º DIA DE ARMAZENAMENTO .....	46

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>13</b>
2.1. BACTERIOCINAS.....	13
2.2. NISINA .....	15
<b>2.2.1. Estabilidade e solubilidade .....</b>	<b>16</b>
2.3. APLICAÇÕES DE NISINA EM PRODUTOS CÁRNEOS .....	17
2.4. APLICAÇÃO DE NISINA EM EMBALAGENS PARA ALIMENTOS .....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1. HIDRATAÇÃO DA TRIPA NATURAL .....	26
<b>3.1.1. Determinação do pH das soluções de hidratação das tripas .....</b>	<b>26</b>
3.2. ATIVIDADE DA NISINA NA TRIPA .....	26
3.3. ATIVIDADE DA NISINA NA TRIPA NATURAL, APLICADA EM SALSICHA .....	27
<b>3.3.1. Produção da Salsicha .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3.2. Delineamento Experimental .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3.3. Análises Microbiológicas .....</b>	<b>31</b>
3.3.3.1. Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas .....	31
3.3.3.2. Enumeração de bactérias láticas .....	31
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
4.1. pH DAS SOLUÇÕES DE HIDRATAÇÃO DAS TRIPAS .....	32
4.2. ATIVIDADE DA NISINA NA TRIPA .....	32
4.3. ATIVIDADE DA NISINA NA TRIPA NATURAL, APLICADA EM SALSICHA .....	34
<b>4.3.1. Estimativa dos efeitos dos fatores para o 1º dia de armazenamento .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3.2. Estimativa dos efeitos dos fatores para o 14º dia de armazenamento ...</b>	<b>38</b>

<b>4.3.3. Estimativa dos efeitos dos fatores para o 28º dia de armazenamento ...</b>	<b>40</b>
<b>4.3.4. Estimativa dos efeitos dos fatores para o 42º dia de armazenamento ...</b>	<b>44</b>
<b>4.3.5. Estimativa dos efeitos dos fatores para o 56º dia de armazenamento ...</b>	<b>45</b>
<b>4.4. EFEITO DA TEMPERATURA .....</b>	<b>48</b>
<b>4.5. EFEITO DA NISINA E DO ÁCIDO FOSFÓRICO .....</b>	<b>50</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, consumidores tem preferido alimentos mais convenientes, de fácil preparo, com aparência de frescos, minimamente processados, livres de conservantes químicos, mais seguros e com maior vida útil. Para prevenir o crescimento de microrganismos patogênicos e inibir a deterioração bacteriana nestes alimentos, uma alternativa promissora é o biocontrole, ou seja, a utilização de microrganismos e/ou seus metabólitos na inibição ou destruição de microrganismos indesejáveis (DE MARTINIS *et al.*, 2002; COTTER *et al.*, 2005).

Neste contexto pode-se citar as bacteriocinas, que são peptídeos com ação antimicrobiana, produzidos por um grande número de bactérias. A maioria das bacteriocinas identificadas são produzidas por bactérias láticas e estas são geralmente consideradas organismos seguros (GRAS, "Generally Recognized As Safe") (GUINANE *et al.*, 2005). Por serem consideradas conservantes naturais, seu emprego em alimentos é muito promissor no controle do desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes.

A nisina é uma bacteriocina, produzida por algumas linhagens de *Lactococcus lactis*, que apresenta ação antimicrobiana sobre vários microrganismos gram-positivos, mas não é eficaz contra gram-negativos, leveduras e bolores. Em 1969 a nisina foi aprovada pela FAO (Food and Agriculture Organization) e pela WHO (World Health Organization) como aditivo em alimentos e atualmente, cerca de 50 países permitem o seu uso em maior ou menor grau (DELVES-BROUGHTON, 1990).

Os embutidos cárneos são produtos alimentícios consumidos em todo o mundo, pois apresentam alta praticidade, diversidade em seu sabor e principalmente baixo custo, pois são provenientes principalmente de carne de baixo valor comercial.

Nos Estados Unidos, segundo o National Hot Dog & Sausage Council, em 2007 foram gastos mais de 4,1 bilhões de dólares na compra de salsichas, sendo cerca de 1,5 bilhões em mercados varejistas (NATIONAL HOT DOG & SAUSAGE COUNCIL, 2009).

A microbiota de salsichas é composta basicamente de microrganismos gram-positivos, como *Micrococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e também leveduras (JAY, 2005). A maioria das bactérias gram-positivas associadas com carne processada possui certa tolerância para alguns obstáculos presentes nestes produtos, como baixa atividade de água e temperatura de refrigeração (DAVIES *et al.*, 1999).

Os produtos cárneos processados, tais como as salsichas, se deterioram devido ao crescimento microbiano, oxidação de pigmentos e gorduras, exsudação e desidratação superficial. A forma predominante de deterioração é determinada pelas características do produto, pela contaminação microbiana inicial, pela temperatura de estocagem, pela higiene

no processamento e manuseio, pelas características da embalagem e pela técnica de acondicionamento empregada. A vida-de-prateleira de salsichas embaladas pode, assim, ser avaliada em termos de crescimento microbiano, cor, sabor e aparência geral (SARANTÓPOULOS *et al.*, 1990).

Recentemente vários trabalhos JOFRÉ *et al.* (2008), MANGALASSARY *et al.* (2008), SIVAROOBAN *et al.* (2007), LÓPEZ-MENDOZA *et al.* (2007), GEORNARAS *et al.* (2006), THEIVENDRAN *et al.* (2006), GRISI e GORLACH-LIRA (2005), CHUNG *et al.* (2005), COOKSEY (2005) tem utilizado nisina em produtos cárneos com o objetivo de inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Os resultados mostram que a eficiência da nisina neste tipo de produto depende de vários fatores, como por exemplo, o microrganismo alvo, a concentração de nisina, a composição do produto e as condições de armazenamento.

De forma a contribuir com o estudo da aplicação de nisina em produtos cárneos, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da bacteriocina nisina sobre bactérias lácticas e bactérias aeróbias mesófilas, quando aplicada no envoltório de salsicha hidratado em solução de ácido fosfórico 0,1% ou água e a influência da temperatura de armazenamento 4 ou 10°C.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. BACTERIOCINAS

Bacteriocinas são peptídeos com ação antibacteriana que variam em seu espectro de atividade, modo de ação, peso molecular, origem genética e propriedades bioquímicas. Cada bacteriocina é produzida por uma espécie de bactéria e em geral é ativa somente sobre outras espécies da mesma bactéria ou espécies relacionadas. Diferem dos antibióticos, pois apresentam um estreito espectro de ação e não induzem efeitos de resistência, uma vez que são inativadas por proteases presentes no sistema digestivo (ABEE *et al.*, 1995; CASSENS, 1994).

Nos últimos anos tem havido um crescente interesse pelo uso de bacteriocinas como conservantes naturais de alimentos. Isoladas ou em combinação com outros agentes antimicrobianos, atuam como ferramentas úteis na redução da carga de patógenos e/ou bactérias deteriorantes dos alimentos. São ainda empregadas como recurso tecnológico na produção de alguns alimentos por serem consideradas conservantes naturais, já que são produzidas por bactérias lácticas, consideradas organismos seguros (GRAS, “Generally Recognized As Safe”) (GUINANE *et al.*, 2005; BARRETO *et al.*, 2004).

Segundo Nascimento *et al.* (2008), as bacteriocinas podem ser utilizadas de três formas no alimento:

- a) Em alimentos fermentados podem ser produzidas *in situ* pela adição de culturas lácticas bacteriocinogênicas no lugar das tradicionais culturas iniciadoras;
- b) Pela adição destas culturas como adjuntas; e
- c) Pela adição direta de bacteriocinas purificadas.

Segundo Klaenhammer (1993), as bacteriocinas podem ser divididas em quatro classes:

- **Classe I:** Peptídeos pequenos (< 5 kDa), contendo aminoácidos incomuns como a lantionina e  $\beta$ -metil lantionina em sua molécula, com atividade sobre a membrana celular microbiana, como exemplo, a nisina, lacticina S, lacticina 481 e a carnocina U149;
- **Classe II:** Peptídeos pequenos (< 10 kDa), estáveis termicamente, com atividade sobre a membrana celular microbiana, mas sem lantionina na molécula. Há três subgrupos: IIa) peptídeos ativos contra *Listeria*, como pediocina PA-1,

sakacina P, leucocina A, curvacina A. IIb) contém dois peptídeos ativos, como lactococcinas G, lactococcinas M e lactacina F. IIc) peptídeos ativados por tiol, dependentes de resíduos de cisteína para sua ação, como lactococcina B.

- **Classe III:** Proteínas termolábeis de alto peso molecular (> 30 kDa), como helveticina J, helveticina V-1829, acidofilucina A, lactacina A e B.
- **Classe IV:** Bacteriocinas complexas, compostas de proteínas e outras moléculas (lipídeos, carboidratos) indispensáveis para atividade, como plantaricina S, leuconocina S, lactocina 27 e pediocina SJ-1.

Em 2005, Cotter *et al.*, propuseram uma nova classificação, a qual divide as bacteriocinas em duas categorias distintas: os lantibióticos (classe I) contendo lantionina e os não-lantibióticos (classe II), enquanto os peptídeos de alto peso molecular termolábeis, anteriormente pertencentes a classe III, seriam designados de “bacteriolisinas” e as bacteriocinas anteriormente pertencentes a classe IV seriam extintas devido a não comprovação científica de sua ação.

A classe I das bacteriocinas lantibióticas, é formada por pequenos peptídeos (19-38 resíduos de aminoácidos) que possuem em sua molécula, resíduos de lantionina ou  $\beta$ -metilantionina e podem ser divididas em função de sua estrutura ou modo de ação, sendo a nisina a principal representante desta classe.

A classe II é formada pelas bacteriocinas que não contém lantionina em sua molécula, são pequenos peptídeos (< 10 kDa), termoestáveis e podem ser subdivididas em: IIa) Composta por bacteriocinas que apresentam alta especificidade contra *L. monocytogenes* e possuem de 37 a 48 resíduos de aminoácidos, por exemplo a pediocina, enterocina, sakacina; IIb) Composta por bacteriocinas que possuem dois peptídeos que atuam em sinergismo, pois individualmente possuem pequena ou nenhuma atividade, pertencem a este grupo a plantaricina e lactacina F e IIc) Composta por bacteriocinas que apresentam estrutura cíclica, por exemplo a enterocina AS-48, a circularina A e a reutericina 6.

Porém, em 2007 Heng *et al.*, propôs alterações na classificação de Cotter *et al.* (2005), onde a classe III (grandes bacteriocinas) não seria extinta e sim subdividida em IIIa) bacteriolisinas e IIIb) proteínas não bacteriolíticas. Já as bacteriocinas cíclicas, classificadas como IIc agora constituem uma nova classe IV e como consequência, a classe IIc passa a ser composta por outros inibidores que não os ativos contra *Listeria* (classe IIa) e bacteriocinas compostas (classe IIb).



## 2.2. NISINA

A nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, descoberta na década de 1930, como resultado da investigação dos efeitos inibitórios de uma toxina presente no leite, sobre culturas “starters” de queijo. Sua aplicação na conservação de alimentos teve início em 1951, com o emprego de culturas produtoras de nisina na produção de queijo (DELVES-BROUGHTON, 1990; DELVES-BROUGHTON e GASSON, 1994).

A nisina é um peptídeo que contém aminoácidos residuais incomuns e anéis de lantionina, sua molécula é formada por 34 aminoácidos, é atóxica, estável termicamente, não altera o sabor ou odor dos alimentos e é destruída pelas enzimas digestivas (DELVES-BROUGHTON, 1990; DELVES-BROUGHTON e GASSON, 1994).

Em 1969 a nisina foi aprovada pela FAO (Food and Agriculture Organization) e pela WHO (World Health Organization) como aditivo em alimentos, sendo a ingestão máxima diária permitida de 33.000 UI/kg corpóreo (MONTVILLE; WINKOWSKI, 1997 *apud* DE MARTINIS *et al.*, 2002).

Cerca de 50 países permitem o uso de nisina em alimentos em maior ou menor grau. Nos EUA, sua utilização em queijos pasteurizados foi aprovada em 1988, na concentração máxima de 10000 UI/g de produto (DELVES-BROUGHTON, 1990). No Brasil a aplicação de nisina é permitida em queijos pasteurizados na concentração máxima de 12,5 mg/kg (BRASIL, 1996). Em 1998 foi também autorizado, pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a utilização do produto comercial Nisaplin® (200 ppm em solução de ácido fosfórico), na superfície externa de salsichas, através da publicação AUP/DOI/DIPOA nº 563/98 (CASTRO, 2002).

Nisaplin® é produzido desde 1953, pela Applin & Barret Ltd., através do processo da fermentação de leite desnatado por cepas de *Lactococcus lactis* produtoras de nisina. Cada grama de Nisaplin® contém aproximadamente 2,5% de nisina o que corresponde a  $10^6$  UI (Unidades Internacionais), ou seja, 1µg de nisina pura equivale a 40 UI. Nisaplin® é um produto extremamente estável, não reduz sua atividade em até dois anos quando estocada em ambiente seco, sem luz e em temperatura abaixo de 25°C (DELVES-BROUGHTON, 2005; JAY, 2005).

Recentemente foi verificado que a nisina apresenta duplo modo de ação: I) Impede a síntese do peptideoglicano na parede celular, neste processo a nisina se liga ao lipídeo II da membrana celular, responsável pelo transporte de peptideoglicano do citoplasma para a

parede celular, impedindo a reconstrução da parede celular. II) Formação de poro na parede celular, neste processo a nisina se liga ao lipídeo II para iniciar um processo de inserção na membrana celular e formação de poro que conduz a rápida morte celular, pois permite o efluxo de pequenos metabólitos (COTTER *et al.*, 2005).

A nisina apresenta ação antimicrobiana sobre vários microrganismos gram-positivos, mas não é eficaz contra gram-negativos, leveduras e bolores (DELVES-BROUGHTON e GASSON, 1994; FRANCO *et al.*, 2006). Sua atividade já foi demonstrada sobre *L. monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus curvatus*, entre outros (HAMPIKYAN e UGUR, 2007; COOKSEY, 2005; LUCHANSKY e CALL, 2004; CASTRO, 2002; MILLETTE *et al.* 2004; LEE *et al.*, 2004a; SIRAGUSA *et al.*, 1999).

A resistência de bactérias gram-negativas a ação da nisina é atribuída a sua parede celular, que apresenta menor permeabilidade em relação às bactérias gram-positivas. Porém a utilização de agentes quelantes, choque osmótico ou congelamento, pode tornar a parede celular permeável a esta bacteriocina (DAVIES *et al.*, 1999; DELVES-BROUGHTON, 2005). O estudo realizado por Gänzle *et al.* (1999) mostrou que a presença de EDTA aumentou a atividade da nisina tornando bactérias gram-negativas sensíveis à esta bacteriocina. A inibição de *Salmonella* em cultura pura pela combinação de nisina e EDTA foi verificada por Grisi e Gorlach-lira (2005), porém este tratamento não apresentou eficiência na inibição do mesmo patógeno em carne de caranguejo. Millette *et al.*, (2004) verificaram que a cultura de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, produtora de nisina, inibiu o crescimento de *Escherichia coli* em meio contendo 10 mM do agente quelante EDTA, no entanto, *Pseudomonas putida* e *Salmonella* Typhi não foram afetados.

Boziaris e Adams (2000) estudaram o efeito do resfriamento rápido e a presença de nisina na população de bactérias gram-negativas e verificaram que *Pseudomonas aeruginosa* foi a mais afetada, seguida por *Pseudomonas fragi*, *Salmonella enteritidis* PT4, PT7 e *Escherichia coli*, respectivamente.

### **2.2.1. Estabilidade e solubilidade**

Nisina é mais solúvel em substratos ácidos e torna-se menos solúvel em pH próximos da neutralidade (DELVES-BROUGHTON *et al.*, 1996). Em pH 2,2 sua solubilidade é cerca de 56 mg/ml, em pH 5,0 é de 3 mg/ml, e em pH 11 é de 1 mg/ml (LIU; HANSEN, 1990 *apud* DELVES-BROUGHTON *et al.*, 1996).

A nisina é estável quando submetida a altas temperaturas de 115 a 121 °C em pH 2, porém na faixa de pH 5 a 7, ela torna-se progressivamente menos estável ao calor (DELVES-BROUGHTON *et al.*, 1996). Uma solução de nisina em pH na faixa de 3,0 a 3,5 quando aquecida a 121°C por 15 min, perde cerca de 10% de sua atividade (DELVES-BROUGHTON, 2005).

A estabilidade da nisina em alimentos durante a estocagem depende de três fatores: temperatura de armazenamento, tempo de estocagem e pH. A maior retenção da atividade de nisina ocorre em baixa temperatura, portanto se o alimento for estocado em temperatura ambiente será necessária uma alta concentração de nisina para compensar a redução na atividade em função da temperatura. No processo de fabricação de queijo cremoso, o tratamento térmico de 85 °C a 105 °C por 5 a 10 minutos, resulta em uma perda de cerca de 20 a 30 % da atividade da nisina e após 30 semanas de estocagem a atividade remanescente é da ordem de 80 % a 20 °C, 60% a 25 °C e 40 % a 30 °C (DELVES-BROUGHTON, 2005). A redução na atividade da nisina também foi verificada por Raju *et al.* (2003), em salsichas de peixe adicionadas de 50 ppm de nisina em sua massa, onde houve uma redução de cerca de 60% em sua atividade durante 60 dias de armazenamento refrigerado, enquanto esta mesma redução ocorreu em apenas 15 dias no armazenamento em temperatura ambiente. Soriano *et al.* (2004), também verificaram uma redução de cerca de 50 % na atividade da nisina após o cozimento de carne de porco a 80 °C por 45 minutos e mais 10 % de redução na atividade durante o armazenamento deste produto a 8 °C por 21 dias.

### 2.3. APLICAÇÕES DE NISINA EM PRODUTOS CÁRNEOS

Entre todos os modos de perda de qualidade, a deterioração microbiológica tem o maior impacto na limitação da vida útil de alimentos perecíveis. Vários estudos têm demonstrado que a aplicação de nisina em produtos cárneos pode aumentar a vida de prateleira do produto ou torná-lo mais seguro através da inibição de microrganismos patogênicos.

Em salsichas cozidas tipo continental embalada a vácuo e armazenadas sob refrigeração, a adição de 1,25 a 6,25 mg de nisina por kg de produto, ou imersão da salsicha cozida em uma solução de 5,0 a 25,0 mg de nisina por litro, aumentou a vida útil do produto (DELVES-BROUGHTON, 2005).

Raju *et al.* (2003) verificaram um aumento na vida útil das salsichas contendo nisina de 2 para 20 dias, quando armazenadas em temperatura ambiente, e de 30 para 150 dias quando armazenadas sob refrigerado. O estudo realizado por Cutter e Siragusa (1998) demonstrou que a adição de 10 µg/ml de nisina na superfície de carne para produção de produtos reestruturados é efetivo na redução da população do microrganismo deteriorante *Brochothrix thermosphacta*, sua atividade foi detectada por até 7 dias nas amostras de carne em pré rigor, porém nas amostras de carne em pós rigor a atividade da nisina foi detectada somente nos dias 0 e 2 da estocagem.

Por outro lado, Lemay *et al.*, (2002) não observaram inibição de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Brochothrix thermosphacta* CRDAV452 e *Lactobacillus alimentarius* BJ33 quando aplicaram nisina, na concentração máxima recomendada pelo fabricante em um modelo de carne de frango acidificada (pH 5,0) sem restrição de temperatura (22 °C).

No estudo realizado por Pereira (2004), foi avaliada a influência da nisina em salsicha, durante o armazenamento e seu papel na vida de prateleira do produto. A nisina foi aplicada utilizando o produto comercial Chrisin, o qual contém nisina na concentração de 10<sup>6</sup> UI/g. As salsichas foram tratadas com adição de nisina na massa na concentração de 200 UI/g e 500 UI/g e/ou por imersão em solução de ácido fosfórico 0,1 % contendo 200 UI/mL e 500 UI/mL. Os resultados mostraram que embora não tenha ocorrido degradação da nisina durante o armazenamento, não houve inibição do crescimento de bactérias mesófilas, portanto a utilização de nisina não resultou em benefício à vida de prateleira das salsichas.

Castro (2002), observou que o tratamento superficial de salsichas com nisina (200 ppm de Nisaplin® em solução de ácido fosfórico 0,1 % grau alimentício), não causou redução significativa na população de bactérias aeróbias mesófilas, psicotróficas e bactérias lácticas, independente da temperatura de armazenamento utilizada (8 ou 12°C). Entretanto o mesmo tratamento reduziu significativamente a população de *L. monocytogenes* em salsichas artificialmente contaminadas, quando o nível de contaminação inicial do alimento era baixo, entre 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> UFC/cm<sup>2</sup> e a temperatura de armazenamento era de 8°C, demonstrando que tanto a carga de contaminação inicial do alimento, como a sua temperatura de armazenamento interferem significativamente sobre o efeito inibitório da nisina sobre células de *L. monocytogenes*.

A inibição de *L. monocytogenes* (10<sup>6</sup> UFC/g) também foi verificada em salsicha fermentada típica da Turquia, durante 20 e 25 dias quando foi utilizada nisina na concentração de 50 e 100 µg/g respectivamente (HAMPIKYAN e UGUR, 2007).

Soriano et al. (2004), verificaram uma redução imediata na população de *L. innocua* em carne de porco cozida adicionada de nisina, durante a estocagem à 8 °C.

Segundo Delves-Broughton (1990), a substituição parcial de nitrito, utilizado em produtos cárneos curados, por nisina, é economicamente inviável, pois apenas altas concentrações de nisina são eficientes no controle de *C. botulinum*, além de que a sua completa substituição não é possível, pois ele é responsável pelo desenvolvimento da coloração rósea e sabor desejado nestes produtos (DELVES-BROUGHTON e GASSON, 1994).

Embora muitos resultados comprovem benefícios do uso de nisina como conservante em produtos cárneos, sua aplicação tem apresentado alguns problemas. Segundo Davies *et al.* (1999), a eficiência da nisina depende da natureza do sistema cárneo e do organismo alvo. Baixa eficácia pode ser resultado da ligação da nisina com proteínas da carne, mistura irregular, pouca absorção dentro da matriz de carne, interferência do fosfolípídeo e instabilidade da nisina ao aquecimento em condições de pH neutro.

Produtos cárneos curados e cozidos diferem consideravelmente em sua formulação, podendo variar no conteúdo de gordura, tamanho da partícula, conteúdo de sal, tipo de fosfato, conteúdo de nitrito, emulsificante, etc, além disso, misturas não homogêneas podem permitir crescimento bacteriano em discretos nichos contendo conservante em quantidade insuficiente. Davies *et al.* (1999) avaliaram a influência do tipo de fosfato e do teor de gordura na inibição do crescimento de bactérias lácticas por nisina em amostras de mortadela embaladas a vácuo e estocadas a 8 °C. Os resultados obtidos demonstraram que o maior grau de inibição de bactérias lácticas foi em mortadela com baixo nível de gordura (25%) contendo difosfato ao invés de ortofosfato. A adição de 25 µg de nisina por grama de produto aumentou significativamente a vida de prateleira do produto. Enquanto as amostras não tratadas deterioraram após 7 dias de estocagem, as amostras contendo nisina não apresentaram sinais de deterioração após 50 dias de estocagem. Por outro lado, Aasen *et al.* (2003) verificaram que embora o conteúdo de gordura presente em salmão seja maior que o presente em carne de frango, a atividade da nisina não foi influenciada.

Em processos de alimentos que não envolvem calor, enzimas proteolíticas podem afetar a estabilidade da nisina. Os aditivos alimentícios, dióxido de titânio e metabissulfito de sódio também afetam desfavoravelmente a estabilidade desta bacteriocina (DELVES-BROUGHTON, 2005).

Rose *et al.* (2002) concluíram que a nisina perde sua atividade em carne crua, pois é inativada pela enzima glutatona S-transferase. Este fato também foi verificado por Stergiou *et al.* (2006). Os autores verificaram que a atividade da nisina é reduzida mais rapidamente em carne crua do que em carne cozida, pois durante o cozimento, ocorre a inativação da enzima glutatona através da perda do grupo sulfidril devido à reação com proteínas da carne.

O estudo realizado por Aasen *et al.* (2003), verificou que em alimentos não tratados termicamente, a atividade proteolítica causou rápida degradação da nisina, sendo a atividade menor que 1% após uma semana em salmão defumado congelado, cortes de frango congelado e em carne de frango crua, porém quando estes alimentos foram tratados termicamente a atividade da nisina permaneceu estável por 4 semanas.

Diversos estudos têm comprovado que a ação antimicrobiana da nisina é potencializada quando utilizada em sinergia com outros tratamentos. Entre os tratamentos utilizados pode-se citar: a adição ácidos orgânicos, adição de outra bacteriocina, adição de outros conservantes naturais, alta pressão.

A combinação de nisina (300 ppm) e ácido láctico (2%) reduziu em 3,95 log a população de *Listeria monocytogenes* em carne moída de porco embalada em atmosfera modificada e estocada à 4°C por 21 dias, enquanto o tratamento somente com o ácido reduziu em 3,45 log. A eliminação do patógeno foi obtida nas amostras com 500 ppm de nisina e 2% de ácido láctico após 7 dias de estocagem (LÓPEZ-MENDOZA *et al.*, 2007).

Geornaras *et al.* (2006) verificaram que a aplicação de ácido acético, ácido láctico ou benzoato de potássio individualmente em salsichas defumadas embaladas a vácuo e estocadas a 10°C reduziu a população de *Listeria monocytogenes* em 0,4 a 1,5 log UFC/cm<sup>2</sup>, porém quando aplicados em conjunto com nisina (5000 UI/ml) a redução foi de 2,1 a 3,3 log UFC/cm<sup>2</sup>, demonstrando que o efeito da nisina é potencializado na presença de ácido.

Gögus *et al.* (2006), verificaram que carne de peixe armazenada a 4°C e tratada com solução de nisina (40 mg/L), ácido láctico (5%) e cobertura (óleo vegetal, cera de abelha e água destilada), não apresentou nenhuma alteração na qualidade sensorial do produto. Os compostos utilizados no tratamento apresentam sinergismo na inibição de bactérias aeróbias mesófilas e *Pseudomonas spp.*

Gögus *et al.* (2004) também verificaram a sinergia entre ácidos e nisina em carcaças de frango na redução bactérias aeróbias mesófilas, *Salmonella* Typhimurium e *Pseudomonas spp.*, pois o tratamento apenas com nisina não foi eficaz.

O tratamento em conjunto de nisina (500 UI/ml) e ácido láctico 1,5 %, por aspersão em carcaças de carne bovina, reduziu em quase 2 log UFC/cm<sup>2</sup> a contagem total de bactérias mesófilas, após 24 horas de sua aplicação. Os autores verificaram uma ação sinérgica entre ácido láctico e nisina, indicando que a condição ácida desta solução na qual a nisina foi utilizada potencializou seu efeito antimicrobiano, pois os resultados utilizando somente ácido láctico ou somente nisina não apresentaram a mesma eficiência (MARTINEZ *et al.*, 2002).

Ariyapitipun *et al.* (1999) verificaram que a imersão de amostras de carne crua em solução de 200 UI/ml de nisina não foi eficiente na inibição dos microrganismos presentes,

apenas apresentou uma redução na população inicial de bactérias aeróbias psicrotróficas. Porém, 2 % de ácido láctico, 2 % de ácido polilático e a combinação de cada ácido e nisina retardou significativamente o crescimento de psicrotróficos e mesófilos da família *Enterobacteriaceae* por 56 dias. A combinação de nisina com ácido láctico ou polilático, retardou o crescimento de *Lactobacillus* somente por 7 dias, o que sugere que a concentração de nisina utilizada contribuiu pouco no efeito antimicrobiano para o aumento da vida útil de carne fresca embalada à vácuo.

O estudo realizado por Sivaroooban *et al.* (2007), avaliou a atividade da nisina (6400 UI/ml), extrato de semente de uva (1 %) e sua combinação na superfície de salsicha de peru para inibição de *L. monocytogenes*. A adição somente de nisina não inibiu o microorganismo estudado, porém a combinação dos antimicrobianos naturais apresentaram grande inibição, chegando a níveis indetectáveis do microorganismo após 21 dias para a salsicha armazenada a 4 ou a 10 °C.

O efeito da combinação de nisina com lactato de sódio ou citrato de sódio, aplicados em salsicha de porco armazenada a 4 °C por 10 dias foi avaliado por Scannell *et al.* (1997). Os resultados indicaram que a combinação de 2 % lactato de sódio e nisina (500 UI/ml) foi a mais efetiva no controle da contagem total de bactérias aeróbias mesófilas, onde não houve nenhum crescimento até o 7º dia.

Luchansky e Call (2004), observaram que após 90 dias de armazenamento a 4°C, houve redução de 1,15 log UFC/embalagem na população de *L. monocytogenes* em salsichas embutidas com tripas de celulose contendo nisina, e formuladas com adição de lactato de potássio e diacetato de sódio, já as salsichas embutidas em tripas contendo nisina e sem a adição dos sais de ácidos orgânicos em sua formulação a redução foi de 0,88 log UFC/embalagem e apenas durante 15 dias de armazenamento.

Mangalassary *et al.* (2008), observaram a sinergia entre a pasteurização e a adição de agentes antimicrobianos (nisina e/ou lisozima) no tratamento de mortadela de peru com baixo teor de gordura na inibição e prevenção do crescimento de *Listeria monocytogenes*. Os tratamentos independentes não foram eficientes, além disso, o tratamento térmico com adição de nisina reduziu a população a níveis indetectáveis após 4 semanas, enquanto que com a adição de nisina e lisozima o tempo foi de apenas 3 semanas, demonstrando um efeito sinérgico entre os compostos antimicrobianos. Nattress *et al.* (2001) também verificaram o sinergismo entre a nisina e a lisozima no controle de bactérias deteriorantes de carne.

Um gel antimicrobiano contendo 7% de gelatina, 25,5 g/l de lisozima-nisina (1:3) e 25,5 g/l de EDTA, inibiu o crescimento durante 4 semanas dos microrganismos gram-positivos (*Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Listeria monocytogenes*) e também apresentou efeito bactericida no crescimento de

*Salmonella* Typhimurium quando aplicado na superfície de presunto cozido e mortadela embalada à vácuo e estocadas a 8°C (GILL e HOLLEY, 2000a).

Amostras de presunto e mortadela inoculadas artificialmente com microrganismos selecionados, foram preparadas com e sem adição de 500 mg/kg de lisozima-nisina (1:3) e 500 mg/kg de EDTA e embaladas à vácuo e mantidas a 8 °C por 4 semanas. O tratamento inibiu o crescimento de *B. thermosphacta* por 4 semanas e o crescimento de *Lb. curvatus* por 3 semanas. Já para *Lc. mesenteroides* e *L. monocytogenes* houve redução no crescimento por 2 semanas nas amostras de mortadela, enquanto que no presunto houve redução no crescimento de *E. coli* O157:H7 por 4 semanas e *S. Typhimurium* por 3 semanas (GILL e HOLLEY, 2000b).

Jofré *et al.* (2008) avaliaram a alta pressão (600 MPa), nisina (800 UI/g) e lactato de potássio (1,8 %) e suas combinações em presunto cozido fatiado contaminado com 4 log UFC/g de *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* durante 3 meses de estocagem a 1 e 6 °C. Os resultados mostraram que a adição dos antimicrobianos e estocagem a 1 °C inibiram *L. monocytogenes*, entretanto a alta pressão e refrigeração menor ou igual a 6 °C foi um sistema muito efetivo no controle de *Salmonella* e *L. monocytogenes* durante os 3 meses. Porém *Staphylococcus aureus* só foi reduzido com a combinação de alta pressão, nisina e baixa temperatura.

A combinação de nisina (100 e 200 ppm), alta pressão (600 MPa, 28 °C, 5 min) e t-butil-hidroquinona (100 e 300 ppm) foi efetiva no controle de *L. monocytogenes* ( $10^6$  até  $10^7$  UFC/g) em salsicha comercial contaminada artificialmente, sugerindo que este tipo de tratamento é um método promissor no controle desta bactéria para produtos pronto para consumo (CHUNG *et al.*, 2005).

O efeito da alta pressão e nisina foi estudada em carne de frango por Castillo *et al.* (2004). Os autores verificaram que a contagem total de bactérias mesófilas foi reduzida em 3 log com a utilização de 300 MPa de pressão e em 5 log quando a nisina (670 UI/g) foi utilizada em conjunto com a alta pressão.

Yuste *et al.* (2002), também estudaram o efeito da alta pressão (350 e 450 MPa) combinada com nisina (0, 12,5, 100 e 200 ppm), acidificação (1 % de glucona-delta-lactona), tempo (5 e 15 minutos) e temperatura (-20 e 20 °C) em carne mecanicamente separada de frango. Houve uma redução no número de microrganismos mesófilos de 5,3 log UFC/g e maior que 7,5 log UFC/g para contagem total de psicrotróficos com o tratamento de 200 ppm de nisina e 450 MPa de pressão por 15 minutos na temperatura de 20 °C.

Os vários estudos apresentados mostram que o uso de bacteriocinas como uma única barreira no crescimento microbiano em alimentos não é a melhor escolha, reforçando a concepção que métodos combinados de conservação podem ser usados como garantia de alimento seguro (DE MARTINIS *et al.*, 2002).



## 2.4. APLICAÇÃO DE NISINA EM EMBALAGENS PARA ALIMENTOS

Embalagem com ação antimicrobiana é uma forma de embalagem ativa que atua na redução, inibição ou retardo do crescimento de microrganismos que podem estar presentes no alimento ou no próprio material de embalagem. Esta tecnologia de embalagem pode aumentar a vida útil dos alimentos e sua segurança principalmente em relação aos microrganismos patogênicos (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002; LEE *et al.*, 2004a). Estudos recentes têm mostrado que a incorporação de nisina na embalagem de alimentos é uma forma promissora de aplicação.

O uso de filmes cobertos com nisina (10000 UI/g) e extratos naturais tem se apresentado como uma segurança adicional e aumentado a qualidade de produtos prontos para consumo. A combinação de extrato de semente de uva ou extrato de chá verde com nisina na embalagem de salsicha da Turquia, reduziu em mais de 2 log a população de *L. monocytogenes* após 28 dias a 4 e 10°C (THEIVENDRAN *et al.*, 2006). Já Sivarooban *et al.* (2008) incorporaram nisina (10000 UI/g), extrato de semente de uva (1 %) e EDTA (0,16 %) em filme de proteína isolada de soja e verificaram que houve melhora nas características físicas do mesmo, além da redução de 2,9, 1,8 e 0,6 log UFC/ml respectivamente nas populações de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* Typhimurium.

A eficácia da nisina é reduzida quando incorporada em filmes se comparada com sua ação em solução. No entanto, filme de polietileno de baixa densidade coberto com solução base de celulose contendo nisina na concentração de 7500 UI/ml reduziram em mais de 2 log UFC/embalagem a população de *L. monocytogenes* em salsichas tipo “hot dog” estocadas por 60 dias sob refrigeração (COOKSEY, 2005).

A aplicação de nisina ( $6,21 \times 10^4$  UI/g) em filme de glúten de trigo foi efetiva na redução da população de *E. coli* quando combinada com a pasteurização na própria embalagem para mortadela fatiada. Houve redução de 8 log UFC/g para menor que 10 UFC/g em 8 semanas de estocagem refrigerada, sendo a redução de aproximadamente 5,5 log atribuída ao tratamento térmico e 2,5 log a presença de nisina no filme. No entanto, este mesmo tratamento não foi efetivo para *Salmonella* Typhimurium (McCORMICK *et al.*, 2005).

A incorporação de Nisaplin®, na concentração máxima de 0,62 µg de nisina por cm<sup>2</sup>, em embalagem de celofane para carne de vitela picada, reduziu em cerca de 1,5 log a contagem total de bactérias aeróbias em 12 dias de armazenamento a 4°C quando comparada com a embalagem sem incorporação de nisina (GUERRA *et al.*, 2005).

Lee *et al.* (2004a), desenvolveram um material de embalagem antimicrobiana e/ou antioxidante que incorporou nisina (na faixa de 222 a 241 µg/ml) e/ou α-tocoferol e avaliaram sua eficiência em uma emulsão do tipo óleo em água e em creme de leite. A incorporação de nisina na embalagem foi efetiva na inibição do microrganismo *Micrococcus flavus* durante 8 dias de estocagem a 10 °C, o qual foi inoculado na concentração inicial de 10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> UFC/ml. A incorporação de α-tocoferol retardou a oxidação lipídica na emulsão e no creme de leite armazenados a 10 °C, no entanto não houve efeito sinérgico para esta combinação.

A avaliação da influência da embalagem antimicrobiana, coberta com nisina e/ou quitosana (obtida por desacetilação da quitina) no crescimento de bactérias aeróbias mesófilas em leite pasteurizado, demonstrou que a eficiência desta embalagem antimicrobiana em reduzir o crescimento microbiológico foi maior em baixas temperaturas. Em temperatura de 3 °C ocorreu a máxima redução da concentração de células, com aumento da fase lag e redução da velocidade específica de crescimento (LEE *et al.*, 2004b).

A incorporação de ácido láurico e nisina em filme termoencolhível de soja foi avaliado por Dawson *et al.* (2002). Os resultados mostraram que o filme contendo apenas nisina reduziu no período de 2 horas 1 log UFC/ml da contaminação inicial de *L. monocytogenes* de 10<sup>6</sup> células em suspensão, mas sua população aumentou para 10<sup>8</sup> após 24 horas a 22 °C, já o filme contendo o ácido e a nisina eliminou completamente a contaminação inicial no período de 8 horas. No entanto quando os mesmos filmes foram utilizados para mortadela de peru refrigerada, somente após 21 dias houve redução na população de 10<sup>6</sup> para 10<sup>5</sup>.

O estudo realizado por Janes *et al.* (2002), mostrou que a aplicação de 1000 UI/g de nisina dispersa em etanol ou propileno glicol, com 1% de propionato de cálcio em filme de Zein não permitiu o desenvolvimento de *L. monocytogenes* por 24 dias a 4 °C. Zein é uma proteína insolúvel em água extraída do milho e é considerada GRAS para uso em alimentos, é solúvel em solventes orgânicos e forma uma cobertura dura e lustrosa.

Hoffman *et al.* (2001), também verificaram que o filme de Zein contendo nisina reduziu a população inicial de 10<sup>8</sup> de *L. monocytogenes* em 1,0 log após 2 horas e em 5,5 log após 48 horas.

A vida útil de ostras frescas foi estendida de 5 para 12 dias e de carne bovina de 5 para 9 dias quando uma embalagem de polietileno de baixa densidade com incorporação de nisina foi utilizada (KIM *et al.*, 2002).

Siragusa *et al.* (1999) incorporaram nisina (0,1 %) em filme de polietileno com o objetivo de aumentar a segurança microbiológica dos alimentos. Pedacos de carne bovina foram inoculados em sua superfície com *Brochothrix thermosphacta* e embalados à vácuo. Uma redução inicial de 2 log foi observada após 2 dias de estocagem à 4 °C e após 20 dias

na mesma temperatura, as embalagens contendo nisina apresentaram contagem significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que as embalagens sem nisina, 5,8 e 7,2 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente.

O uso de embalagens com adição de agentes antimicrobianos não substituem as boas práticas de fabricação, mas podem ser consideradas uma barreira adicional para a segurança dos alimentos, em relação ao crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (COOKSEY, 2005).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. HIDRATAÇÃO DA TRIPA NATURAL**

As tripas naturais de ovino (fornecidas pela empresa KRAKI) foram inicialmente lavadas em água corrente para eliminação do excesso de sal. Em seguida, foram imersas em água potável por 2 horas para sua hidratação e após este procedimento, imersas por 1h e 40 min em 4 diferentes soluções de hidratação, conforme descrito abaixo:

- a) Hidratação em água potável (controle);
- b) Hidratação em solução de ácido fosfórico (0,1%);
- c) Hidratação em solução de nisaplin® (200 mg/L), fornecido pela empresa DANISCO;
- d) Hidratação em solução de ácido fosfórico 0,1% e nisaplin® (200 mg/L).

##### **3.1.1. Determinação do pH das soluções de hidratação das tripas**

Após o preparo das soluções utilizadas para a hidratação das tripas, foi determinado seu pH em potenciômetro (marca: Micronal).

#### **3.2. ATIVIDADE DA NISINA NA TRIPA**

A atividade da nisina foi avaliada pelo método de difusão em agar (PARENTE e HILL, 1992) com algumas modificações, para soluções aquosa com 200, 400 e 600 mg/L de nisaplin® e em solução de ácido fosfórico 0,1% com 200 e 600 mg/L de nisaplin® e para tripas naturais hidratadas nas mesmas soluções. Como controle foi utilizado água destilada estéril. Este teste foi realizado com o objetivo de comparar a atividade da nisina em solução com a atividade da nisina na tripa hidratada na mesma solução.

Em cerca de 20 ml de Agar De Man, Rogosa & Sharpe (MRS – Oxoid) previamente esterilizado e resfriado a 45°C, foi inoculado 1 ml da cultura indicadora de *Lactobacillus sakei* ATTC 15521, cultivada em caldo MRS por 24 horas. O agar foi transferido para uma placa de Petri estéril e após sua solidificação foi realizado, com material estéril, poço de 5 mm de diâmetro. Em cada poço foi adicionado 40 µL da solução com nisina e na mesma placa foi colocado um pedaço de tripa hidratada na mesma solução, de cerca de 9 mm de diâmetro. As placas foram colocadas sob refrigeração por 1 hora para difusão da solução e em seguida colocadas em estufa à 30 °C por 24 horas. A atividade da bacteriocina foi determinada através da medida do halo de inibição, em mm, obtido a partir da distância da borda externa do poço ou da amostra de tripa até a borda externa do halo no meio de cultura.

### 3.3. ATIVIDADE DA NISINA NA TRIPA NATURAL, APLICADA EM SALSICHA

#### 3.3.1. Produção da Salsicha

As salsichas foram produzidas na planta piloto do laboratório de Engenharia de Alimentos nas instalações do Instituto Mauá de Tecnologia.

A formulação utilizada na produção das salsichas foi sugerida pela empresa KRAKI (Kienast & Kratschmer Ltda.), e está apresentada na tabela 1. Os aditivos e condimentos para a fabricação das salsichas foram utilizados na forma de compacto, ou seja, em um único produto, o Compacto Salsicha 314 (KRAKI), o qual é composto de: sal refinado, estabilizante tripolifosfato de sódio, estabilizante polifosfato de sódio, realçador de sabor glutamato monossódico, especiarias naturais, antioxidante eritorbato de sódio, conservante nitrito de sódio e aromatizantes. A carne bovina, suína e a gordura suína foram adquiridas em açougue em São Caetano do Sul, porcionadas para produção de cada lote, congeladas a -18°C e retiradas do congelador apenas 2 horas antes de cada processamento.

TABELA 1 - FORMULAÇÃO DA SALSICHA

INGREDIENTES	(%)
Carne bovina (acém)	25,75
Carne suína (paleta)	30,75
Gordura suína (toucinho)	15,00
Compacto Salsicha 314	1,00
Sal (NaCl)	2,00
Gelo	25,50

O diagrama de blocos da produção das salsichas está representado na figura 1, o qual foi sugerido pela empresa KRAKI (Kienast & Kratschmer Ltda.). A carne bovina, suína e a gordura suína foram moídas em moedor convencional no próprio açougue onde foram adquiridas. Na planta piloto, as carnes, bovina e suína e a gordura suína foram homogeneizadas em homogeneizador (STEPHAN/GEIGER, UMMSK–25/40E) e em seguida foi adicionado o sal, o Compacto Salsicha 314 (KRAKI) e o gelo até a formação de uma pasta homogênea, ou seja, a formação da emulsão. A massa foi embutida em tripa natural (previamente submetida aos tratamentos descritos no item 3.2) com o auxílio de embutideira (MADO, MWF 591). Em seguida, as salsichas foram cozidas em estufa seca com circulação de ar a 60°C até desenvolvimento de coloração rósea (cerca de 1,5 h a 2 h) e após, cozidas no vapor de forma que a temperatura interna do produto permanecesse a 74°C por 15 minutos. As salsichas cozidas foram resfriadas em água potável e posteriormente armazenadas em câmara fria a 4°C por 24 horas. Após este procedimento, as salsichas foram embaladas a vácuo em embalagens coextrusadas T73xxB (CRYOVAC Sealed Air Corporation) e armazenadas em temperatura estabelecidas para cada ensaio 4 ou 10°C por até 56 dias.

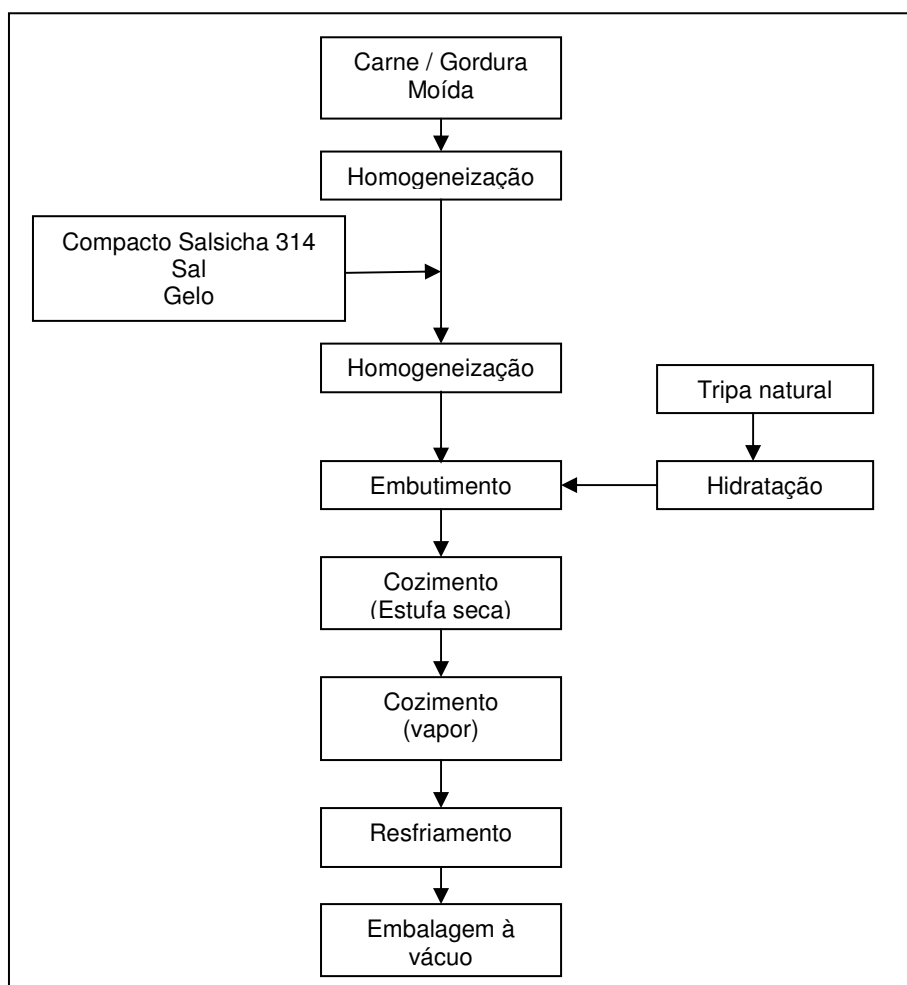


FIGURA 1 - DIAGRAMA DE BLOCOS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA SALSICHA

### 3.3.2. Delineamento Experimental

Para a realização dos experimentos foi empregada a metodologia do planejamento fatorial, onde foram avaliados 3 fatores: a solução de hidratação da tripa, a adição de nisina e a temperatura de armazenamento das salsichas. Cada variável foi estudada em 2 níveis de acordo com um planejamento fatorial completo  $2^3$  (BRUNS *et.al*, 1995), totalizando 8 experimentos, que foram repetidos em 2 ou 3 blocos, sendo cada bloco um lote de produção. A tabela 2 apresenta os níveis de cada variável independente e a tabela 3 e a figura 2 apresentam as condições dos 8 experimentos. Como resposta, foram determinadas as populações de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias lácticas nos dias 01, 14, 28, 42 e 56 do período de estocagem. Para avaliação dos resultados foi utilizado o software Minitab™ versão 15 (Minitab, Inc. State College, EUA).

TABELA 2 - VARIÁVEIS INDEPENDENTES E NÍVEIS ESTUDADOS

Variáveis Independentes	Variáveis Codificadas	Níveis	
		-1	+1
Solução de hidratação	$X_1$	água	ácido
Nisaplin® (mg/L)	$X_2$	0	200
Temperatura (°C)	$X_3$	4	10

TABELA 3 - ENSAIOS REALIZADOS DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO  $2^3$ 

Experimento	( $X_1$ ) Solução de hidratação	( $X_2$ ) Nisina	( $X_3$ ) Temperatura Armazenamento
T1	-1	-1	-1
T2	+1	-1	-1
T3	-1	+1	-1
T4	+1	+1	-1
T5	-1	-1	+1
T6	+1	-1	+1
T7	-1	+1	+1
T8	+1	+1	+1

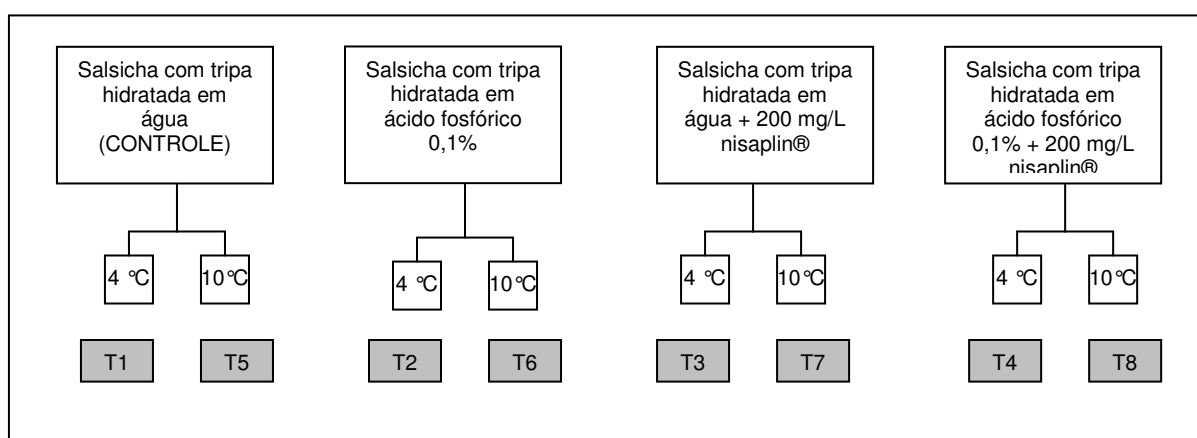


FIGURA 2: ESQUEMA DE TRATAMENTOS DAS SALSICHAS



### 3.3.3. Análises Microbiológicas

A enumeração das populações de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias láticas foi realizada nos dias 01, 14, 28, 42 e 56 do período de estocagem.

Uma unidade analítica de 25 g foi retirada assepticamente de cada embalagem das salsichas e homogeneizada com 225 ml de água peptonada a 0,1% estéril, em saco plástico de polietileno. A amostra foi homogeneizada em Stomacher 400 (Seward Medical) por um minuto e diluições decimais seriadas foram realizadas em água peptonada a 0,1%.

#### 3.3.3.1. Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas

A partir das diluições decimais seriadas, alíquotas de 1 ml de diluições adequadas foram transferidas para placas de Petri vazias, em duplicada. A seguir, foram adicionados cerca de 15 ml de Agar Padrão para Contagem (PCA – Merck) previamente fundido e resfriado a 45°C. Após homogeneização e completa solidificação do agar, as placas foram incubadas invertidas a 35°C  $\pm$  1°C por 48 horas (MORTON, 2001). O número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi determinado nas placas de diluições adequadas e os resultados expressos em log UFC/g.

#### 3.3.3.2. Enumeração de bactérias láticas

A partir das diluições decimais seriadas, alíquotas de 1 ml de diluições adequadas foram transferidas para placas de Petri vazias em duplicata. A seguir, adicionou-se cerca de 15 ml de Agar De Man, Rogosa & Sharpe (MRS – Oxoid) previamente fundido e resfriado a 45°C. As amostras foram adequadamente homogeneizadas e após a completa solidificação do meio de cultura, as placas foram incubadas a 30°C durante 48 horas em jarra de anaerobiose (Oxoid) com sistema de exaustão de oxigênio (Anaerogen® - Oxoid) (HALL *et al*, 2001). O número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi determinado nas placas de diluições adequadas e os resultados expressos em log UFC/g.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. pH DAS SOLUÇÕES DE HIDRATAÇÃO DAS TRIPAS

A média dos valores do pH das soluções utilizadas na hidratação das tripas estão apresentados na tabela 4.

TABELA 4 – pH DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NA HIDRATAÇÃO DAS TRIPAS

Solução	pH*
Água	5,4 ± 0,2
Água + 200 mg/L nisaplin®	4,62 ± 0,06
Ácido fosfórico 0,1%	2,28 ± 0,03
Ácido fosfórico 0,1% + 200 mg/L nisaplin®	2,27 ± 0,03

\* média de três repetições e desvio padrão

### 4.2. ATIVIDADE DA NISINA NA TRIPA

A tabela 5 apresenta os valores médios e desvio padrão, da distância da borda externa do poço ou da amostra da tripa até a borda externa do halo no meio de cultura obtidos pelo método de difusão em agar. A atividade antimicrobiana da nisina sobre o microrganismo *Lactobacillus sakei*, foi verificada tanto para as soluções quanto para as tripas hidratadas nas mesmas soluções, entretanto os halos obtidos com as tripas apresentaram tamanho significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que os halos da solução, exceto para a solução de 200 mg/L de nisaplin® com ácido fosfórico 0,1%. No entanto, foi verificado que o aumento da concentração de nisaplin® ocasionou um aumento no tamanho do halo, tanto para a solução quanto para a tripa.

As figuras 3, 4 e 5 apresentam respectivamente imagens do teste de difusão em agar, realizado para avaliar a atividade da nisina em solução (controle, 400 mg/L e 600 mg/L) e em tripa hidratada na mesma solução.

TABELA 5 – ATIVIDADE DE INIBIÇÃO NO TESTE DE DIFUSÃO EM AGAR

Solução	Medida do halo de inibição (Média ± DP)	
	Poço (mm)	Tripa (mm)
Água (CONTROLE)	0	0
Água + 200 mg/L nisaplin®	2,1 <sup>a</sup> ± 0,5	0,9 <sup>b</sup> ± 0,3
Água + 400 mg/L nisaplin®	5,6 <sup>a</sup> ± 0,3	4,0 <sup>b</sup> ± 0,8
Água + 600 mg/L nisaplin®	6 <sup>a</sup> ± 1	5 <sup>b</sup> ± 1
Ácido fosfórico 0,1%	0	0
Ácido fosfórico 0,1% + 200 mg/L nisaplin®	2,3 <sup>a</sup> ± 0,5	3,3 <sup>b</sup> ± 0,5
Ácido fosfórico 0,1% + 600 mg/L nisaplin®	6,4 <sup>a</sup> ± 0,8	5 <sup>b</sup> ± 2

\*Médias com letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

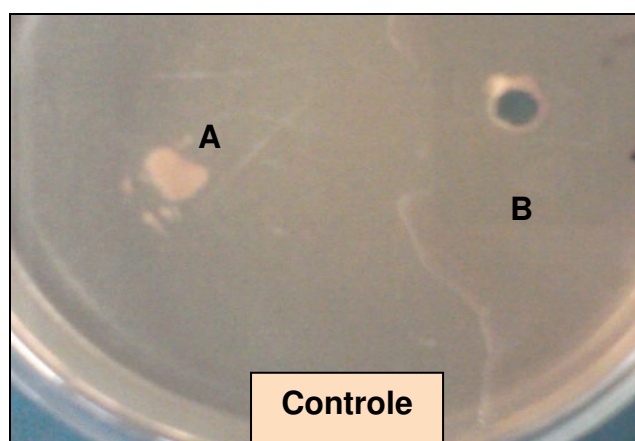


FIGURA 3: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NISINA PRESENTE NA TRIPA HIDRATADA COM SOLUÇÃO CONTROLE (A) E EM POÇO COM SOLUÇÃO CONTROLE (B).

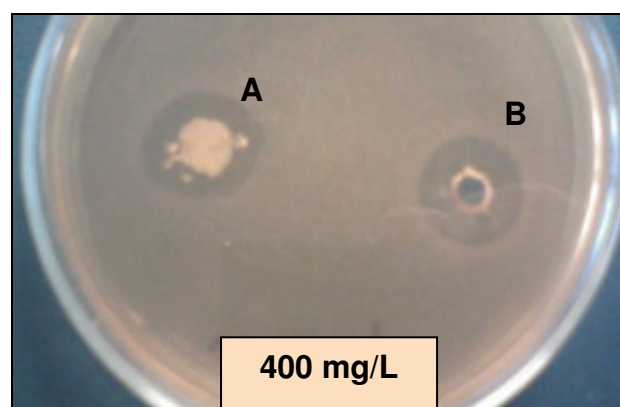


FIGURA 4: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NISINA PRESENTE NA TRIPA HIDRATADA COM SOLUÇÃO DE NISAPLIN® 400 mg/L (A) E EM SOLUÇÃO DE MESMA CONCENTRAÇÃO (B).

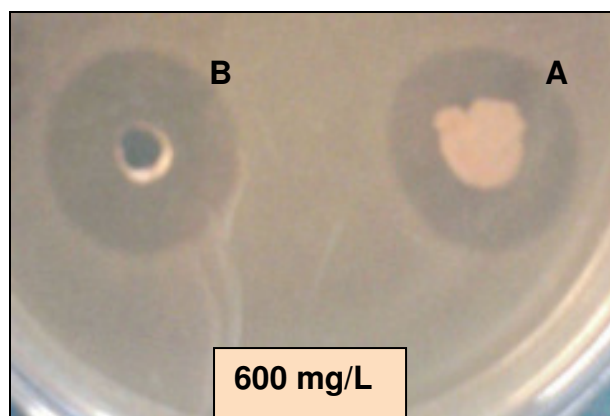


FIGURA 5: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NISINA PRESENTE NA TRIPA HIDRATADA COM SOLUÇÃO DE NISAPLIN® 600 mg/L (A) E EM SOLUÇÃO DE MESMA CONCENTRAÇÃO (B).

#### 4.3. ATIVIDADE DA NISINA NA TRIPA NATURAL, APLICADA EM SALSICHA

As tabelas 6, 7 e 8 apresentam respectivamente as populações de bactérias aeróbias mesófilas de cada lote de produção, presente nas salsichas, nos 8 tratamentos realizados, durante 56 dias de armazenamento.

TABELA 6 - POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS (LOG UFC/g) PRESENTE NAS SALSICHAS PRODUZIDAS NO LOTE I

Tratamento	Solução de hidratação	Nisaplin® (mg/L)	Temperatura Armazenamento (°C)	Log UFC/g				
				Tempo (dias)				
				1	14	28	42	56
T1	água	0	4	2,93	4,43	6,12	7,40	6,62
T2	ácido	0	4	3,16	3,41	3,62	4,98	ND*
T3	água	200	4	2,85	3,59	4,88	6,54	6,76
T4	ácido	200	4	2,40	2,90	3,40	5,00	6,83
T5	água	0	10	2,93	7,05	8,33	7,90	7,06
T6	ácido	0	10	3,16	6,36	7,33	6,40	6,64
T7	água	200	10	2,85	6,44	6,04	8,26	7,85
T8	ácido	200	10	2,40	6,53	7,68	6,85	6,27

ND : Resultado não disponível.

TABELA 7 - POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS (LOG UFC/g) PRESENTE NAS SALSICHAS PRODUZIDAS NO LOTE II

Tratamento	Solução de hidratação	Nisaplin® (mg/L)	Temperatura Armazenamento (°C)	Log UFC/g				
				Tempo (dias)				
				1	14	28	42	56
T1	água	0	4	2,15	3,19	4,57	6,43	6,43
T2	ácido	0	4	2,74	4,04	5,99	7,40	7,25
T3	água	200	4	3,06	3,40	6,50	6,34	6,20
T4	ácido	200	4	2,90	2,48	3,45	5,73	6,85
T5	água	0	10	2,93	6,90	7,63	7,76	7,13
T6	ácido	0	10	2,74	7,56	8,00	8,05	6,98
T7	água	200	10	3,06	6,88	7,72	7,76	7,87
T8	ácido	200	10	2,98	6,93	6,27	6,81	6,48

TABELA 8 - POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS (LOG UFC/g) PRESENTE NAS SALSICHAS PRODUZIDAS NO LOTE III

Tratamento	Solução de hidratação	Nisaplin® (mg/L)	Temperatura Armazenamento (°C)	Log UFC/g				
				Tempo (dias)				
				1	14	28	42	56
T1	água	0	4	3,90	4,80	7,30	7,40	7,60
T2	ácido	0	4	3,19	3,63	5,94	5,68	6,65
T3	água	200	4	3,60	4,80	5,50	6,30	7,20
T4	ácido	200	4	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
T5	água	0	10	3,90	ND*	7,90	7,60	7,60
T6	ácido	0	10	3,19	6,66	ND*	ND*	6,70
T7	água	200	10	3,60	5,90	7,00	7,80	7,50
T8	ácido	200	10	3,23	5,21	7,96	6,60	7,70

ND : Resultado não disponível.

As tabelas 9 e 10 apresentam respectivamente as populações de bactérias lácticas de cada lote de produção, presente nas salsichas, nos 8 tratamentos realizados, durante 56 dias de armazenamento.

TABELA 9 - POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS (LOG UFC/g) PRESENTE NAS SALSICHAS PRODUZIDAS NO LOTE I

Tratamento	Solução de hidratação	Nisaplin® (mg/L)	Temperatura Armazenamento (°C)	Log UFC/g				
				Tempo (dias)				
				1	14	28	42	56
T1	água	0	4	2,74	2,98	6,05	6,72	6,70
T2	ácido	0	4	3,28	ND*	6,16	6,96	7,13
T3	água	200	4	2,81	4,70	4,79	5,98	6,77
T4	ácido	200	4	2,40	ND*	3,63	4,51	6,20
T5	água	0	10	2,74	6,95	8,29	7,70	7,61
T6	ácido	0	10	2,78	6,31	7,32	ND*	7,37
T7	água	200	10	2,81	6,60	6,90	8,14	7,88
T8	ácido	200	10	2,40	5,14	7,66	6,78	6,00

ND : Resultado não disponível.

TABELA 10 - POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS (LOG UFC/g) PRESENTE NAS SALSICHAS PRODUZIDAS NO LOTE II

Tratamento	Solução de hidratação	Nisaplin® (mg/L)	Temperatura Armazenamento (°C)	Log UFC/g				
				Tempo (dias)				
				1	14	28	42	56
T1	água	0	4	2,70	3,13	5,02	6,30	6,60
T2	ácido	0	4	3,10	4,66	6,62	6,93	7,36
T3	água	200	4	3,15	4,10	6,39	6,79	6,95
T4	ácido	200	4	3,20	3,08	3,46	6,67	6,73
T5	água	0	10	2,70	7,33	7,36	7,67	7,19
T6	ácido	0	10	3,10	7,36	7,77	7,57	7,65
T7	água	200	10	3,15	7,07	7,54	7,51	7,62
T8	ácido	200	10	3,26	7,13	7,24	7,50	7,42

#### 4.3.1. Estimativa dos efeitos dos fatores para o 1º dia de armazenamento

As tabelas 11 e 12 apresentam os valores dos efeitos de cada termo avaliado do planejamento fatorial na população de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias lácticas, respectivamente, após 1 dia de armazenamento. Foram considerados significativos os termos com p-valor < 0,1.

TABELA 11 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS PARA O 1º DIA DE ARMAZENAMENTO

Termo	Efeito	p-valor
Solução de hidratação ( $X_1$ )	-0,25	0,235
Nisina ( $X_2$ )	-0,11	0,591
Temperatura ( $X_3$ )	0,12	0,564
Solução de hidratação * Nisina ( $X_1 * X_2$ )	-0,16	0,448
Solução de hidratação * Temperatura ( $X_1 * X_3$ )	-0,01	0,961
Nisina * Temperatura ( $X_2 * X_3$ )	-0,01	0,961
Solução de hidratação * Nisina * Temperatura ( $X_1 * X_2 * X_3$ )	0,12	0,564

TABELA 12 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PARA O 1º DIA DE ARMAZENAMENTO

Termo	Efeito	p-valor
Solução de hidratação ( $X_1$ )	0,09	0,601
Nisina ( $X_2$ )	0,01	0,977
Temperatura ( $X_3$ )	-0,05	0,748
Solução de hidratação * Nisina ( $X_1 * X_2$ )	-0,25	0,161
Solução de hidratação * Temperatura ( $X_1 * X_3$ )	-0,05	0,748
Nisina * Temperatura ( $X_2 * X_3$ )	0,07	0,683
Solução de hidratação * Nisina * Temperatura ( $X_1 * X_2 * X_3$ )	0,07	0,683

Verifica-se nas tabelas 11 e 12, que os fatores avaliados (nisina e solução de hidratação) não tiveram uma influência significativa ( $p > 0,1$ ) na população de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias lácticas nas salsichas com 1 dia de armazenamento. A

influência da temperatura não poderia ser significativa, já que as salsichas foram armazenadas em diferentes temperaturas somente após a retirada da amostra do 1º dia.

#### 4.3.2. Estimativa dos efeitos dos fatores para o 14º dia de armazenamento

As tabelas 13 e 14 apresentam os valores dos efeitos de cada termo avaliado do planejamento fatorial na população de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias lácticas, respectivamente, após 14 dias de armazenamento. Foram considerados significativos os termos com p-valor < 0,1.

TABELA 13 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS PARA O 14º DIA DE ARMAZENAMENTO

<b>Termo</b>	<b>Efeito</b>	<b>p-valor</b>
Solução de hidratação ( $X_1$ )	-0,50	0,096
Nisina ( $X_2$ )	-0,60	0,047
Temperatura ( $X_3$ )	3,00	0,000
Solução de hidratação * Nisina ( $X_1 * X_2$ )	-0,21	0,451
Solução de hidratação * Temperatura ( $X_1 * X_3$ )	0,35	0,232
Nisina * Temperatura ( $X_2 * X_3$ )	0,00	0,994
Solução de hidratação * Nisina * Temperatura ( $X_1 * X_2 * X_3$ )	0,18	0,525

TABELA 14 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PARA O 14º DIA DE ARMAZENAMENTO

<b>Termo</b>	<b>Efeito</b>	<b>p-valor</b>
Solução de hidratação ( $X_1$ )	-0,18	0,660
Nisina ( $X_2$ )	-0,31	0,456
Temperatura ( $X_3$ )	2,94	0,000
Solução de hidratação * Nisina ( $X_1 * X_2$ )	-0,83	0,077
Solução de hidratação * Temperatura ( $X_1 * X_3$ )	-0,32	0,439
Nisina * Temperatura ( $X_2 * X_3$ )	-0,19	0,638
Solução de hidratação * Nisina * Temperatura ( $X_1 * X_2 * X_3$ )	0,63	0,155



Verifica-se na tabela 13 que a solução de hidratação ( $X_1$ ), a nisina ( $X_2$ ) e a temperatura ( $X_3$ ) influenciaram significativamente a população de bactérias aeróbias mesófilas. No entanto, na tabela 14 foram significativos os termos da temperatura ( $X_3$ ) e a interação entre a solução de hidratação e a nisina ( $X_1 \times X_2$ ) na população de bactérias lácticas.

O efeito da solução de hidratação na população de bactérias aeróbias mesófilas foi de -0,50 (Tabela 13), indicando que as salsichas embutidas em tripa hidratada com ácido fosfórico, apresentaram em média uma população 0,5 log UFC/g menor que as salsichas embutidas em tripa hidratada com água. Da mesma forma, o efeito da nisina na população de bactérias aeróbias mesófilas foi de -0,60 (Tabela 13), indicando que as salsichas embutidas em tripa hidratada com nisina apresentaram em média uma população 0,6 log UFC/g menor que as salsichas embutidas em tripa hidratada sem nisina.

Já o efeito da temperatura foi de 3,00 (Tabela 13) para as bactérias aeróbias mesófilas e 2,94 (Tabela 14) para as bactérias lácticas, sendo este o fator que apresentou a maior influência em relação aos avaliados, demonstrando que as salsichas armazenadas a 4 °C apresentaram populações de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias lácticas em torno de 3,0 log UFC/g menor do que quando armazenadas a 10 °C. Estes resultados indicam que as bactérias presentes nas salsichas armazenadas a 4 °C apresentaram uma fase lag maior.

Para a população de bactérias lácticas, foi verificada uma interação significativa entre a solução de hidratação e a nisina ( $p = 0,077$ ), como apresentado na figura 6. Nas salsichas armazenadas a 4°C sem nisina, embutidas em tripa hidratada com ácido fosfórico, a população de bactérias lácticas foi em média 1,6 log UFC/g maior que aquelas embutidas em tripa hidratada apenas em água. Este resultado pode ser justificado pela redução do pH na superfície das salsichas, já que a solução de ácido fosfórico utilizada na hidratação da tripa apresentou pH de 2,28 (Tabela 4). A redução do pH, provavelmente causou a redução no crescimento de bactérias aeróbias mesófilas e portanto reduziu o número de bactérias competidoras para as bactérias lácticas que por sua vez são mais resistentes ao baixo pH. Verifica-se ainda na figura 6, que a ação da nisina ocorreu apenas quando o ácido fosfórico foi utilizado. Neste caso, as salsichas sem nisina apresentaram população de bactérias lácticas, em média 1,5 log UFC/g maior do que as salsichas com nisina. Nas salsichas armazenadas a 10°C embutidas em tripa hidratada em ácido a presença de nisina causou uma redução de 0,7 log UFC/g na população de bactérias lácticas.

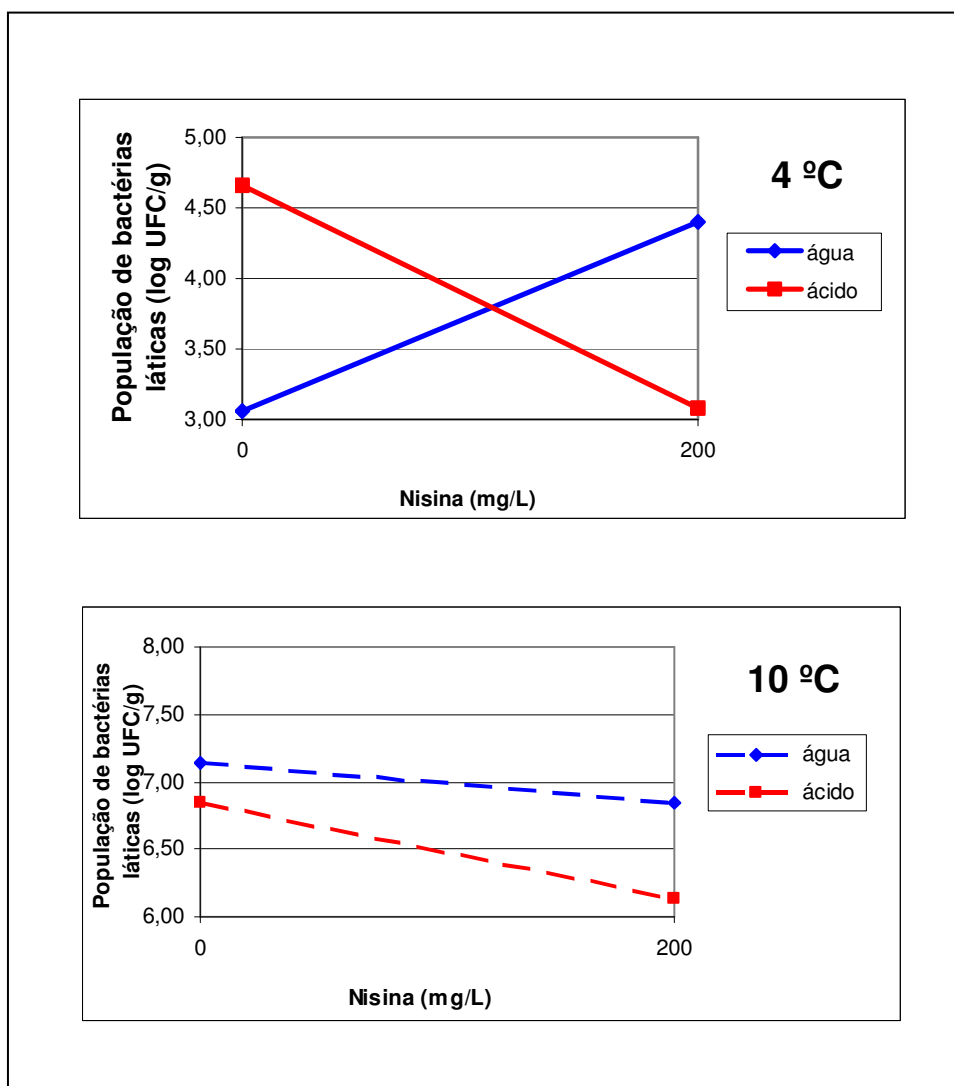


FIGURA 6 - EFEITO DA NISINA, SOLUÇÃO DE HIDRATAÇÃO E TEMPERATURA NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS, NAS SALSICHAS NO 14º DIA DE ARMAZENAMENTO

#### 4.3.3. Estimativa dos efeitos dos fatores para o 28º dia de armazenamento

As tabelas 15 e 16 apresentam os valores dos efeitos de cada termo avaliado do planejamento fatorial na população de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias láticas, respectivamente, após 28 dias de armazenamento. Foram considerados significativos os termos com p-valor < 0,1.

TABELA 15 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS PARA O 28º DIA DE ARMAZENAMENTO

Termo	Efeito	p-valor
Solução de hidratação ( $X_1$ )	-0,73	0,094
Nisina ( $X_2$ )	-0,88	0,048
Temperatura ( $X_3$ )	2,40	0,000
Solução de hidratação * Nisina ( $X_1 * X_2$ )	-0,18	0,666
Solução de hidratação * Temperatura ( $X_1 * X_3$ )	0,78	0,076
Nisina * Temperatura ( $X_2 * X_3$ )	0,18	0,658
Solução de hidratação * Nisina * Temperatura ( $X_1 * X_2 * X_3$ )	0,51	0,225

TABELA 16 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS PARA O 28º DIA DE ARMAZENAMENTO

Termo	Efeito	p-valor
Solução de hidratação ( $X_1$ )	-0,31	0,322
Nisina ( $X_2$ )	-0,87	0,018
Temperatura ( $X_3$ )	2,24	0,000
Solução de hidratação * Nisina ( $X_1 * X_2$ )	-0,60	0,076
Solução de hidratação * Temperatura ( $X_1 * X_3$ )	0,28	0,360
Nisina * Temperatura ( $X_2 * X_3$ )	0,52	0,113
Solução de hidratação * Nisina * Temperatura ( $X_1 * X_2 * X_3$ )	0,85	0,020

Verifica-se na tabela 15 que a solução de hidratação ( $X_1$ ), a nisina ( $X_2$ ), a temperatura ( $X_3$ ) e a interação entre solução de hidratação e temperatura ( $X_1 * X_3$ ) são fatores significativos com p-valor < 0,1. Na tabela 16 são significativos a nisina ( $X_2$ ), a temperatura ( $X_3$ ), a interação entre solução de hidratação e a nisina ( $X_1 * X_2$ ) e a interação entre solução de hidratação, nisina e a temperatura ( $X_1 * X_2 * X_3$ ).

O efeito da nisina na população de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias lácticas foi de -0,88 e -0,87 respectivamente (Tabelas 15 e 16), indicando que a população destes microrganismos foi em média 0,9 log UFC/g menor nas salsichas contendo nisina.

A temperatura apresentou um efeito de 2,40 e 2,24 (Tabelas 15 e 16), nas populações de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias lácticas respectivamente, indicando que as salsichas armazenadas na temperatura de 4 °C, apresentaram uma população destes microrganismos em torno de 2,3 log UFC/g menor que nas armazenadas a 10 °C,

demonstrando que neste período do armazenamento, a temperatura ainda é um fator muito importante no controle destes microrganismos.

A solução de hidratação apresentou um efeito de -0,73 (Tabela 15) na população de bactérias aeróbias mesófilas o que representa uma redução em média de 0,7 log UFC/g na população deste microrganismo, quando a hidratação das tripas foi realizada em solução de ácido fosfórico comparada com a hidratação em água. Entretanto, como a interação entre diluente e temperatura foi significativa ( $p = 0,076$ ), o efeito destes dois fatores deve ser avaliado em conjunto, conforme apresentado na figura 7. As salsichas armazenadas a 4°C, hidratadas em solução de ácido fosfórico apresentaram uma população deste microrganismo em média 1,5 log UFC/g menor do que as hidratadas em água, no entanto quando foram armazenadas a 10 °C, o tipo de diluente não influenciou o crescimento das bactérias aeróbias mesófilas.

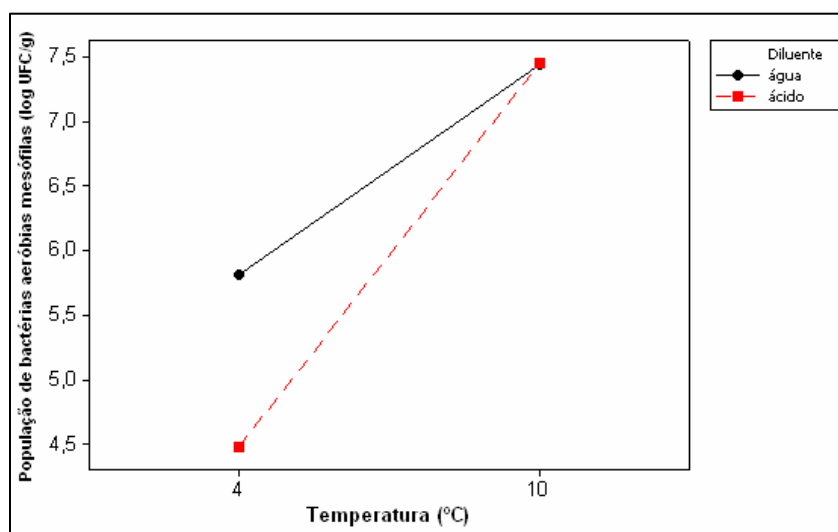


FIGURA 7 - EFEITO DA SOLUÇÃO DE HIDRATAÇÃO E DA TEMPERATURA NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS, PARA O 28º DIA DE ARMAZENAMENTO

Já para as bactérias lácticas, foi verificada uma interação significativa ( $p = 0,076$ ) entre a solução de hidratação e a nisina, assim como já havia ocorrido com 14 dias de armazenamento e uma interação significativa entre os três fatores ( $p = 0,020$ ). Estas interações podem ser melhor compreendidas através da observação da figura 8. Nas salsichas armazenadas a 4 °C, o ácido fosfórico potencializou o efeito da nisina, pois a população de bactérias lácticas era em média de 6,4 log UFC/g nas salsichas sem nisina e

3,5 log UFC/g nas salsichas com nisina, portanto uma diferença de 2,9 log UFC/g, enquanto a nisina diluída em água não apresentou efeito inibidor a 4 °C. Entretanto, na temperatura de 10 °C a adição de nisina na presença de ácido não influenciou o crescimento de bactérias lácticas.

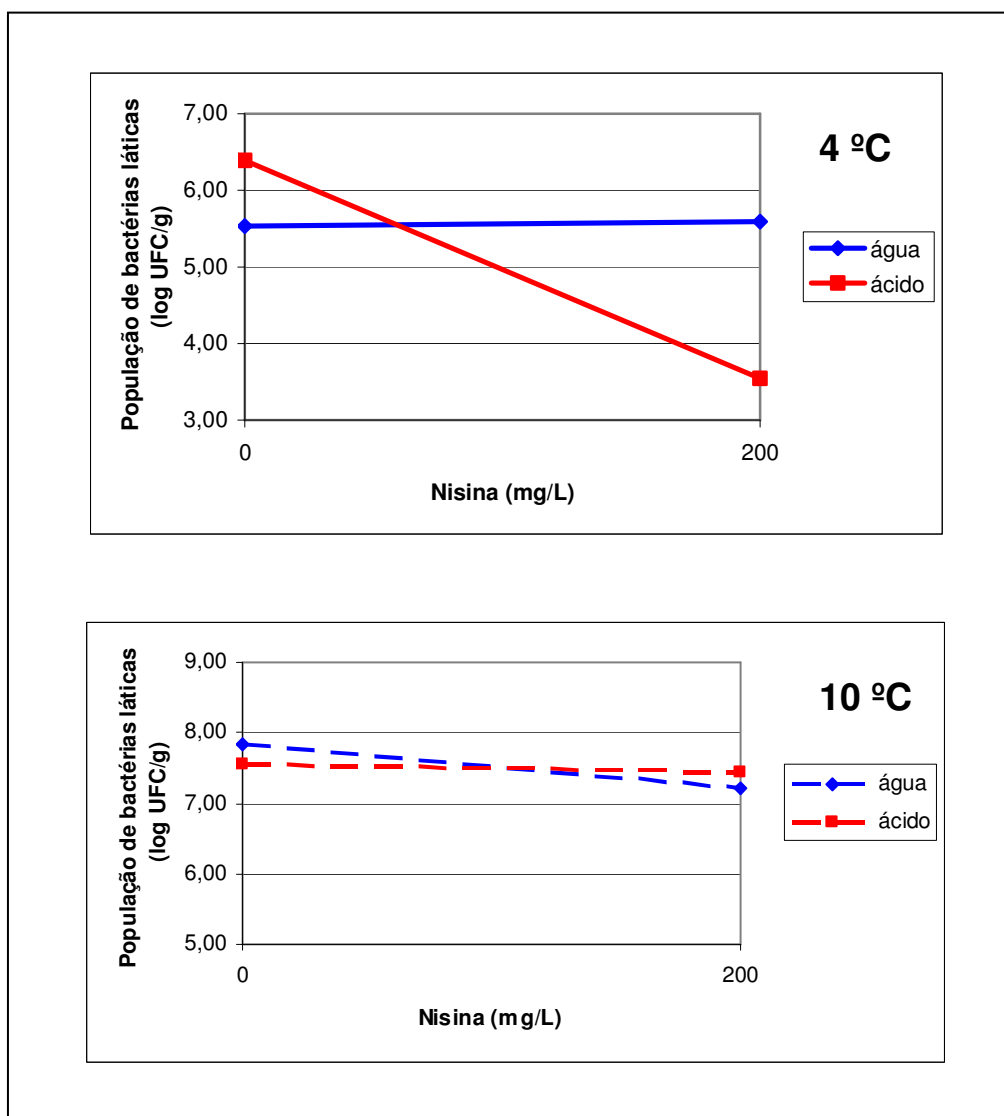


FIGURA 8 - EFEITO DA NISINA, SOLUÇÃO DE HIDRATAÇÃO E TEMPERATURA NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS, NAS SALSICHAS NO 28º DIA DE ARMAZENAMENTO

#### 4.3.4. Estimativa dos efeitos dos fatores para o 42º dia de armazenamento

As tabelas 17 e 18 apresentam os valores dos efeitos de cada termo avaliado do planejamento fatorial na população de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias láticas, respectivamente, após 42 dias de armazenamento. Foram considerados significativos a os termos com p-valor < 0,1.

TABELA 17 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS PARA O 42º DIA DE ARMAZENAMENTO

Termo	Efeito	p-valor
Solução de hidratação ( $X_1$ )	-0,95	0,004
Nisina ( $X_2$ )	-0,41	0,161
Temperatura ( $X_3$ )	1,20	0,001
Solução de hidratação * Nisina ( $X_1 * X_2$ )	-0,16	0,575
Solução de hidratação * Temperatura ( $X_1 * X_3$ )	0,09	0,741
Nisina * Temperatura ( $X_2 * X_3$ )	0,26	0,354
Solução de hidratação * Nisina * Temperatura ( $X_1 * X_2 * X_3$ )	-0,17	0,542

TABELA 18 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS PARA O 42º DIA DE ARMAZENAMENTO

Termo	Efeito	p-valor
Solução de hidratação ( $X_1$ )	-0,29	0,446
Nisina ( $X_2$ )	-0,44	0,258
Temperatura ( $X_3$ )	1,20	0,012
Solução de hidratação * Nisina ( $X_1 * X_2$ )	-0,45	0,250
Solução de hidratação * Temperatura ( $X_1 * X_3$ )	-0,11	0,768
Nisina * Temperatura ( $X_2 * X_3$ )	0,30	0,435
Solução de hidratação * Nisina * Temperatura ( $X_1 * X_2 * X_3$ )	0,16	0,660

Verifica-se na tabela 17 que a solução de hidratação ( $X_1$ ) e a temperatura ( $X_3$ ) são fatores significativos com p-valor < 0,1. Na tabela 18 foi considerado significativo a temperatura ( $X_3$ ) com p-valor < 0,1.

O efeito da temperatura foi de 1,2 para bactérias aeróbias mesófilas (Tabela 17) e para as bactérias láticas (Tabela 18), demonstrando que as salsichas armazenadas a 4 °C apresentaram populações destes microrganismos em média 1,2 log UFC/g menor do que quando armazenadas a 10 °C. Dentre os fatores avaliados, até este período de armazenamento, a temperatura apresentou a maior influencia sobre o crescimento dos microrganismos.

Já para a solução de hidratação o efeito obtido foi de -0,95 (Tabela 17), demonstrando que quando foi utilizado ácido fosfórico na hidratação das tripas o desenvolvimento de bactérias aeróbias mesófilas foi em média 1,0 log UFC/g menor do que quando foi utilizada água para a mesma operação. Entretanto a presença de ácido não inibiu o crescimento de bactérias láticas, possivelmente devido à maior resistência destes microrganismos à condição ácida, conforme já verificado anteriormente com 14 e 28 dias de armazenamento.

#### 4.3.5. Estimativa dos efeitos dos fatores para o 56º dia de armazenamento

As tabelas 19 e 20 apresentam os valores dos efeitos de cada termo avaliado do planejamento fatorial para a população de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias láticas, respectivamente, após 56 dias de armazenamento. Foram considerados significativos os termos com p-valor < 0,1.

TABELA 19 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS PARA O 56º DIA DE ARMAZENAMENTO

<b>Termo</b>	<b>Efeito</b>	<b>p-valor</b>
Solução de hidratação ( $X_1$ )	-0,31	0,148
Nisina ( $X_2$ )	0,06	0,762
Temperatura ( $X_3$ )	0,30	0,156
Solução de hidratação * Nisina ( $X_1 * X_2$ )	-0,09	0,642
Solução de hidratação * Temperatura ( $X_1 * X_3$ )	-0,40	0,065
Nisina * Temperatura ( $X_2 * X_3$ )	0,20	0,338
Solução de hidratação * Nisina * Temperatura ( $X_1 * X_2 * X_3$ )	-0,12	0,553

TABELA 20 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS PARA O 56º DIA DE ARMAZENAMENTO

Termo	Efeito	p-valor
Solução de hidratação ( $X_1$ )	-0,18	0,401
Nisina ( $X_2$ )	-0,25	0,251
Temperatura ( $X_3$ )	0,54	0,031
Solução de hidratação * Nisina ( $X_1 * X_2$ )	-0,53	0,032
Solução de hidratação * Temperatura ( $X_1 * X_3$ )	-0,28	0,207
Nisina * Temperatura ( $X_2 * X_3$ )	0,03	0,888
Solução de hidratação * Nisina * Temperatura ( $X_1 * X_2 * X_3$ )	-0,04	0,851

Na tabela 19 foi considerado significativo a interação entre a solução de hidratação e a temperatura ( $X_1 * X_3$ ) com p-valor < 0,1. Já na tabela 20, foi considerado significativo a temperatura ( $X_3$ ) e a interação entre solução de hidratação e a nisina, com p-valor < 0,1.

O efeito da temperatura na população de bactérias lácticas foi de 0,54 (Tabela 20), indicando que a população desses microrganismos foi em média 0,5 log UFC/g menor quando as salsichas foram armazenadas a 4 °C comparando com as mesmas armazenadas a 10 °C. Neste tempo de armazenamento a temperatura já não influencia de forma tão significativa quanto influenciou até 42 dias de armazenamento.

A nisina, não apresentou mais efeito significativo na população de bactérias aeróbias mesófilas, assim como já observado em 42 dias de armazenamento.

Na figura 9, está apresentada a interação entre a solução de hidratação e a temperatura na população de bactérias aeróbias mesófilas. Verifica-se que a 4 °C a população foi praticamente a mesma independente da solução utilizada, entretanto quando o armazenamento ocorreu na temperatura de 10 °C e a solução utilizada foi o ácido, a população deste microrganismo foi em média 0,7 log UFC/g menor do que quando a solução utilizada foi a água. Em resumo, o ácido inibiu o crescimento de bactérias aeróbias mesófilas apenas nas salsichas armazenadas a 10 °C.



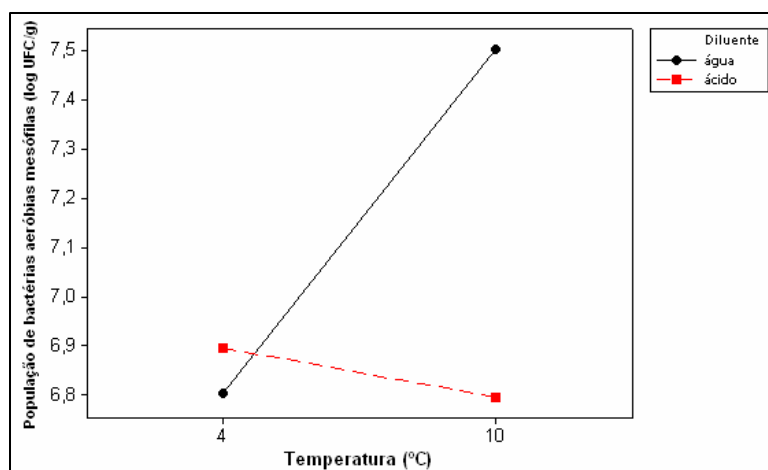


FIGURA 9 - EFEITO DA SOLUÇÃO DE HIDRATAÇÃO E DA TEMPERATURA NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS, PARA O 56º DIA DE ARMAZENAMENTO

Para as bactérias lácticas foi verificada uma interação entre a solução de hidratação e a nisina, conforme apresentado na figura 10. Assim como verificado no 14º e 28º dias de armazenamento, o ácido fosfórico potencializou a ação da nisina. Nas salsichas onde a tripa foi hidratada com ácido, a nisina reduziu a população de bactérias lácticas em média 0,8 log UFC/g. Por outro lado, a nisina não apresentou efeito inibidor nas salsichas com tripa hidratadas em água. Entretanto para este período de armazenamento, as contagens microbiológicas já estavam muito elevadas e os produtos não apresentam mais valor comercial, pois segundo CASTRO (2002), contagens entre 7 e 8 log UFC/g são compatíveis com produtos cárneos em deterioração.

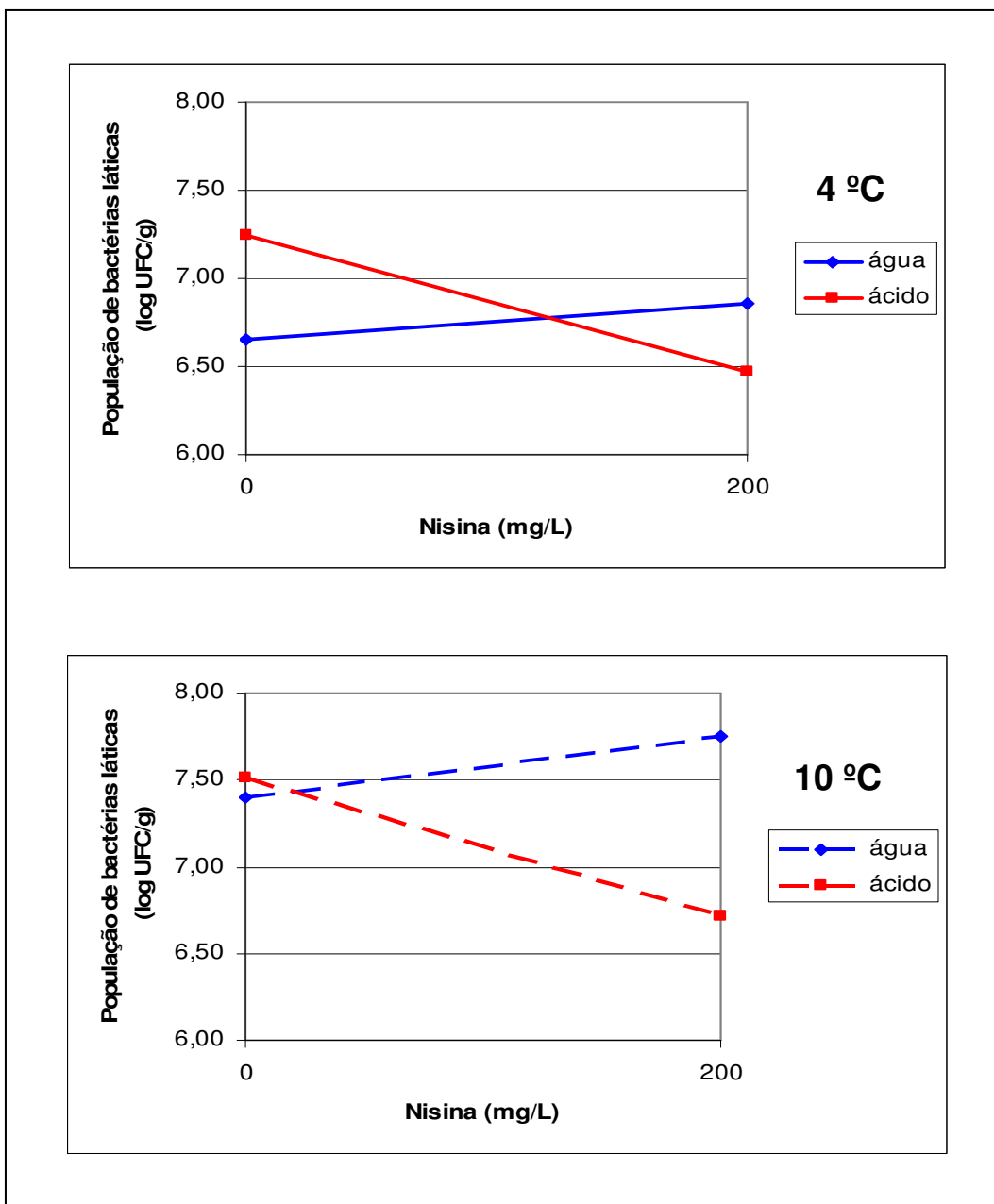


FIGURA 10: EFEITO DA NISINA, SOLUÇÃO DE HIDRATAÇÃO E TEMPERATURA NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS, NAS SALSICHAS NO 56º DIA DE ARMAZENAMENTO

#### 4.4. EFEITO DA TEMPERATURA

A temperatura de armazenamento é sem dúvida um fator que influencia diretamente a velocidade do desenvolvimento de microrganismos. Nakashima (2001) em seu trabalho sobre a modelagem do crescimento de bactérias mesófilas e lácticas em

salsichas verificou que nas temperaturas de estocagem mais alta (12 °C, 16 °C e 20 °C) a velocidade de crescimento de bactérias mesófilas e bactérias láticas era maior do que nas temperaturas mais baixas (4 °C e 8 °C). Segundo Lee *et al.* (2004b), baixas temperaturas aumentam a fase lag e reduzem a velocidade específica de crescimento dos microrganismos. No presente trabalho a influência da temperatura ficou muito evidente tanto para o crescimento de bactérias aeróbias mesófilas quanto para bactérias láticas. Observa-se na figura 11, que apresenta a média da população de bactérias mesófilas e de bactérias láticas para as salsichas armazenadas a 4 e 10 °C, que a maior influência da temperatura ocorreu no 14º dia do armazenamento, onde houve uma diferença média de 3,0 log UFC/g, na população de bactérias aeróbias mesófilas e também de bactérias láticas, entre as salsichas estocadas a 10°C e 4 °C.

Ao longo do período de armazenamento, a influencia deste fator foi reduzindo gradativamente, sendo que no 28º dia de armazenamento a diferença foi em média 2,3 log UFC/g, no 42º dia 1,2 log UFC/g e no 56º dia 0,4 log de UFC/g na população das bactérias mesófilas e láticas nas salsichas armazenadas a 10 e 4 °C. No entanto na pesquisa realizada por CASTRO (2002), a temperatura de armazenamento de 8 ou 12 °C não influenciou significativamente na redução da população de bactérias aeróbias mesófilas, psicrotróficas e bactérias láticas.

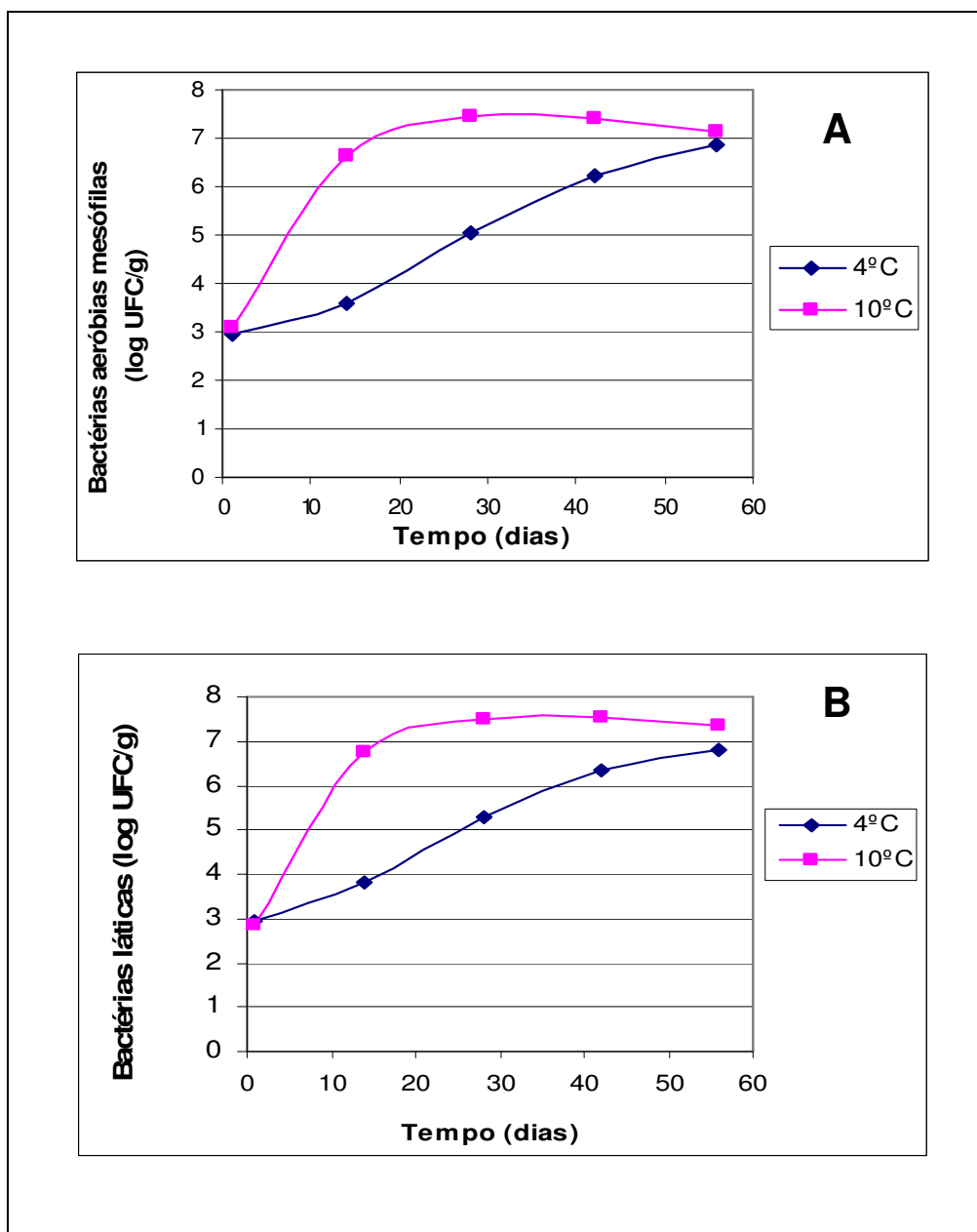


FIGURA 11: INFLUÊNCIA MÉDIA DA TEMPERATURA NOS 8 TRATAMENTOS DURANTE O ARMAZENAMENTO DAS SALSICHAS NA POPULAÇÃO DE: A) BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS E B) BACTÉRIAS LÁTICAS

#### 4.5. EFEITO DA NISINA E DO ÁCIDO FOSFÓRICO

A solução de ácido fosfórico 0,1% apresentou ação antimicrobiana sobre o crescimento de bactérias mesófilas, apresentando a máxima atividade no 28º dia do armazenamento a 4 °C, onde as salsichas com tripa hidratada em ácido apresentaram em

média uma população 1,5 log UFC/g menor que as salsichas com tripa hidratada em água. Esse resultado pode ser explicado pela redução do pH da tripa, de 5,4 para 2,3 quando hidratada em ácido fosfórico e também pela maior população de bactérias lácticas (cerca de 1 log UFC/g) nas salsichas com tripa hidratada em ácido. Conforme verificado por Nakashima (2001), as bactérias lácticas, durante o armazenamento de salsichas, produzem ácido láctico que reduz o pH do produto. No presente estudo, embora o pH das salsichas não tenha sido determinado, é provável que as salsichas com maior população de bactérias lácticas apresentassem menor pH, contribuindo assim para a redução da população de bactérias mesófilas.

A nisina apresentou atividade antimicrobiana sobre bactérias aeróbias mesófilas apenas no 14º e 28º dia de armazenamento a 4 °C e a 10 °C. Com 14 dias de estocagem, as salsichas com nisina apresentaram um número de bactérias mesófilas, em média 0,6 log UFC/g menor que nas salsichas sem nisina e no 28º dia, essa diferença passou para 0,9 log UFC/g. É possível que a redução na população de bactérias mesófilas nas salsichas com tripa contendo nisina, seja conseqüência também da redução do pH na superfície do produto, já que a tripa com nisina apresentava pH de 4,6 e a tripa hidratada em água pH 5,4. No estudo realizado por Martinez *et al.* (2002), a aplicação de nisina (500 UI/ml) em carcaça bovina não reduziu a população de bactérias mesófilas, o que era esperado, já que a microbiota do produto era composta em sua maioria por bactérias gram-negativas. Pereira (2004) também não observou atividade antimicrobiana da nisina sobre bactérias mesófilas, quando adicionada na massa de salsicha e/ou em solução onde o produto foi imerso. Entretanto, Guerra *et al.* (2005) verificaram que a nisina aplicada em embalagem de celofane, reduziu o crescimento de bactérias mesófilas em carne de vitela. A diferença entre os resultados obtidos é provavelmente devido às variações existentes entre a microbiota predominante nos diferentes alimentos, já que a nisina apresenta atividade apenas sobre determinadas bactérias gram-positivas.

A combinação de nisina e ácido fosfórico não apresentou interação significativa sobre a população de bactérias mesófilas ao longo do armazenamento, dessa forma pode-se afirmar que a atividade da nisina sobre estes microrganismos não aumentou na presença do ácido fosfórico. Por outro lado, Martinez *et al.* (2002), verificaram que a aplicação conjunta de nisina e ácido láctico na superfície de carcaça bovina apresentou maior eficiência na redução de bactérias mesófilas que a utilização dos compostos separadamente.

Com relação ao crescimento de bactérias lácticas, a nisina apresentou atividade antimicrobiana apenas quando utilizada em conjunto com o ácido fosfórico. A atividade da nisina também foi maior quando as salsichas foram armazenadas a 4 °C. O baixo pH (2,3) da solução de ácido fosfórico na qual a nisina foi adicionada deve ter sido responsável pelo aumento de sua ação sobre as bactérias lácticas. A ação sinérgica entre a nisina e diferentes

ácidos na inibição de microrganismos gram-positivos já foi comprovado por outros autores (GEORNARAS *et al.*, 2006; LÓPEZ-MENDOZA *et al.*, 2007; DELVES-BROUGHTON, 2005). A figura 12 apresenta a população média de bactérias lácticas nas salsichas durante o armazenamento a 4°C. Verifica-se que durante todo o período de armazenamento a 4°C, a população de bactérias lácticas, nas salsichas com tripa hidratada em solução de nisina e ácido, era menor que nas salsichas com tripa hidratada apenas em ácido. A maior atividade da nisina ocorreu no 28º dia de armazenamento, quando a população de bactérias lácticas nas salsichas contendo nisina e ácido era cerca de 3 log UFC/g menor que naquelas sem a bacteriocina.

O ácido fosfórico isoladamente não inibiu o crescimento das bactérias lácticas, e nos produtos sem nisina favoreceu o desenvolvimento desses microrganismos.

A conservação de salsichas embalada à vácuo através da aplicação de nisina e ácido na superfície do produto também foi avaliada por Ariyapitipun *et al.* (1999) e Castro (2002). Entretanto os autores não verificaram efeito significativo na redução da população de bactérias lácticas durante o armazenamento refrigerado, diferentemente do observado no presente estudo. Ariyapitipun *et al.* (1999) e Castro (2002) adicionaram a nisina ao produto por aspersão ou imersão em solução, enquanto que no presente estudo a incorporação da nisina juntamente com o ácido na etapa de hidratação da tripa provavelmente permitiu maior absorção da bacteriocina.

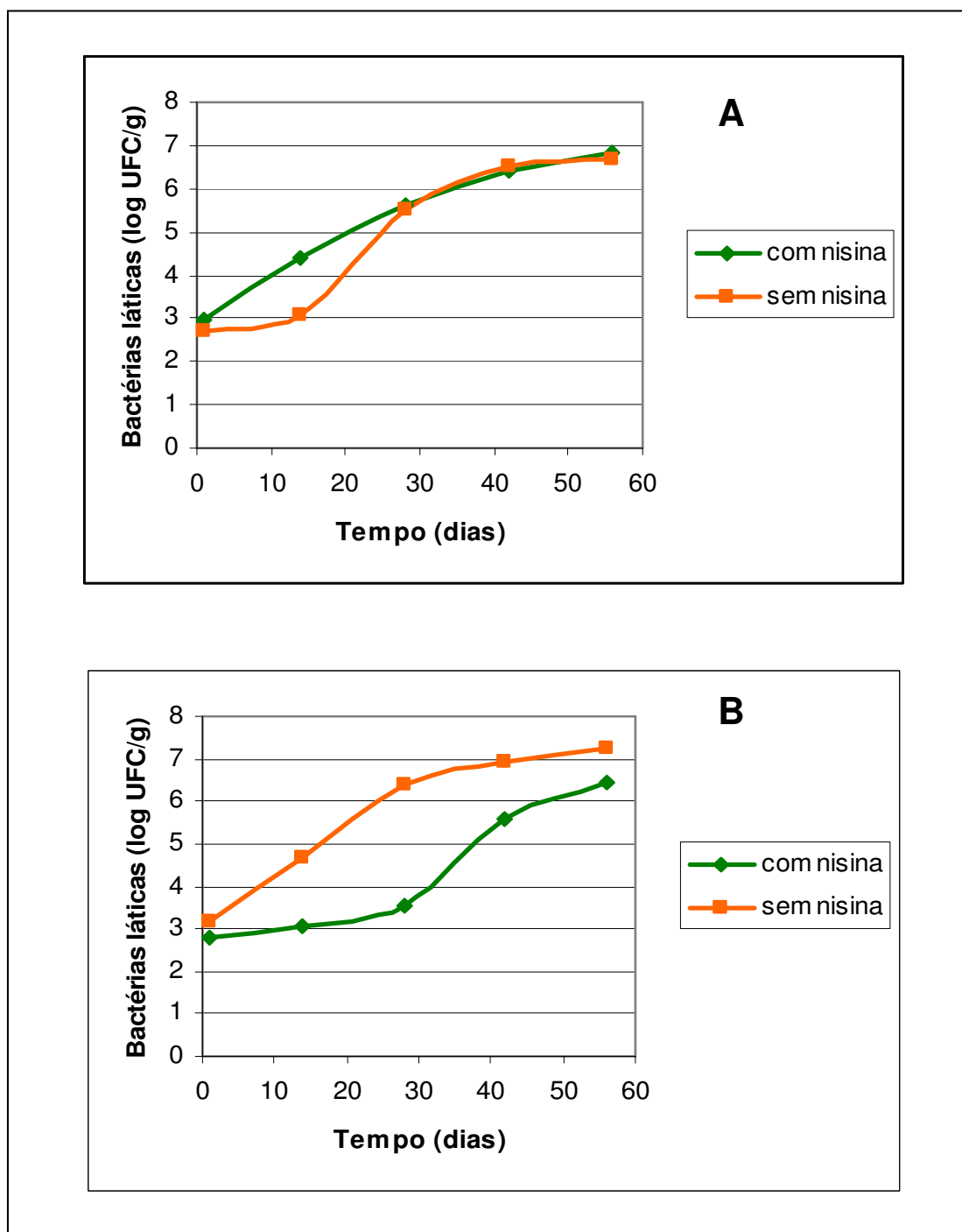


FIGURA 12: INFLUÊNCIA DA SOLUÇÃO DE HIDRATAÇÃO NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS, NAS SALSICHAS ARMAZENADAS A 4 °C: A) HIDRATAÇÃO EM ÁGUA B) HIDRATAÇÃO EM ÁCIDO

## 5. CONCLUSÃO

- A hidratação das tripas em ácido fosfórico 0,1% não inibiu a multiplicação de bactérias láticas.
- A hidratação das tripas em ácido fosfórico 0,1% inibiu a multiplicação de bactérias mesófilas.
- A ação da nisina sobre bactérias láticas foi potencializada na presença de ácido fosfórico.
- A ação da nisina foi maior na temperatura de armazenamento mais baixa (4°C).
- A aplicação conjunta de nisina e ácido fosfórico na etapa de hidratação da tripa, somado ao armazenamento em baixa temperatura (4°C), são obstáculos que apresentam potencial no controle do crescimento de bactérias láticas em salsicha.



## REFERÊNCIAS

- AASEN, I. M.; MARKUSSEN, S.; MORETRO, T.; KATLA, T.; AXELSSON, L.; NATERSTAD, K. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p. 35-43, 2003.
- ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 169-185, 1995.
- APPENDINI, P. e HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, p. 113-126, 2002.
- ARIYAPITIPUN, T.; MUSTAPHA, A.; CLARKE, A. D. Microbial shelf life determination of vacuum-packaged fresh beef treated with polylactic acid, lactic acid, and nisin solutions. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 8, p. 913-920, 1999.
- BARRETO, N. S. E.; VIEIRA, R. H. S. F.; VIEIRA, G. H. F.; SILVA, M. E. C. Aplicação de bacteriocinas nos alimentos: uma revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 126 / 127, p. 44-50, nov. dez. 2004.
- BOZIARIS, I.S. e ADAMS, M.R. Transient sensitivity to nisin in cold-shocked gram negatives. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 233-237, 2000.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996. **Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 22 de jan. de 1996**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 08 ago. 2006.
- BRUNS, R. E.; NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2. ed. Campinas: Editora Unicamp, 1995.
- CASSENS, R.G. **Meat Preservation**: preventing losses and assuring safety. Connecticut: Food & Nutrition Press, 1994. 125 p.
- CASTILLO A.; L.A., MÉSZÁROS, L.; KISS, I. F. Effect of high hydrostatic pressure and nisin on micro-organisms in minced meats. **Acta Alimentaria**, v.33, n. 2, p. 183-190, 2004
- CASTRO, A. P. **Sobrevivência de bactérias aeróbias mesófilas, psicrotróficas, bactérias lácticas e *Listeria monocytogenes* em salsichas submetidas a tratamento com nisina**. São Paulo, 2002. 91p (Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

CHUNG, Y. K.; VURMA, M.; TUREK, E.J.; CHISM, G. W.; YOUSEF, A. E. Inactivation of barotolerant *Listeria monocytogenes* in sausage by combination of high-pressure processing and food-grade additives. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 4, p. 744-750, 2005.

COOKSEY, K. Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 10, p. 980-987, 2005.

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

CUTTER, C. N.; SIRAGUSA, G. R. Incorporation of nisin into a meat binding system to inhibit bacteria on beef surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p. 19-23, 1998.

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

DAWSON, P. L.; CARL, G. D.; ACTON, J. C.; HAN, I. Y. Effect of lauric acid and nisin-impregnated soy-based film on the growth of *Listeria monocytogenes* on turkey bologna. **Poultry Science**, v. 81, p. 721-726, 2002.

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

DELVES-BROUGHTON, J.; BLACKBURN, P.; EVANS, R. J.; HUGENHOLTZ, J. Applications of the bacteriocin, nisin. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 69, p. 193-202, 1996.

DELVES-BROUGHTON, J. e GASSON, M.J. Nisin. In: DILLON, V.M.; BOARD, R.G. **Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation**. Wallingford: Cab International, p. 99-131. 1994.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its uses as a food preservative. **Food Technology**, p. 100-112, nov 1990.

DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, v.18, n. 2 & 3, p. 191-208, 2002.

FRANCO, B.D.G.M.; DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F. Bacteriocinas de bactérias lácticas e suas aplicações em produtos cárneos. In: SHIMOKOMAKI, M. **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. São Paulo: Varela, 2006. p. 63-71.

GÄNZLE, M. G.; WEBER, S.; HAMMES, W. P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 207-217, 1999.

GEORNARAS, I.; SKANDAMIS, P. N.; BELK, K. E.; SCANGA, J. A.; KENDALL, P. A.; SMITH, G. C.; SOFOS, J. N. Post-processing application of chemical solutions for control of *Listeria monocytogenes*, cultured under different conditions, on commercial smoked sausage formulated with and without potassium lactate-sodium diacetate. **Food Microbiology**, v. 23, p. 762-771, 2006.

GILL, A. O. e HOLLEY, R. A. Surface application of lysozyme, nisin, and EDTA to inhibit spoilage and pathogenic bacteria on ham and bologna. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 10, p. 1338-1346, 2000a.

GILL, A. O. e HOLLEY, R. A. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. **Food Research International**, v. 33, p. 83-90, 2000b.

GÖGÜS, U.; BOZOGLU, F.; YURDUGUL, S. Comparative effects of lactic acid, nisin, coating combined and alone applications on some postmortem quality criteria of refrigerated *sardina pilchardus*. **Journal of Food Quality**, v. 29, p. 658-671, 2006.

GÖGÜS, U.; BOZOGLU, F.; YURDUGUL, S. The effects of nisin, oil-wax coating and yogurt on the quality of refrigerated chicken meat. **Food Control**, v. 15, p. 537-542, 2004.

GRISI, T.C.S.L. e GORLACH-LIRA, K. Action of nisin and high pH on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. in pure culture and in the meat of land crab (*Ucides cordatus*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 151-156, 2005.

GUERRA, N. P.; MACÍAS, C. L.; AGRASAR, A. T.; CASTRO, L. P. Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin® as biopreservative agent. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 106-110, 2005.

GUINANE, C. M.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. A Review: Microbial solution to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1316-1325, 2005.

HALL, P. A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R. S. Acid-Producing Microorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association, 4 ed., 2001, p. 201-207.

HAMPIKYAN, H. e UGUR, M. The effect of nisin on *L. monocytogenes* in Turkish fermented sausage (sucuks). **Meat Science**, v. 76, p. 327-332, 2007.

HENG, N.C.K.; WESCOMBE, P.A.; BURTON, J.P.; JACK, R.W.; TAGG J.R. The diversity of bacteriocins in gram-positive bacteria. In: RILEY, M.A. e CHAVAN, M.A. **Bacteriocins: Ecology and Evolution**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007, p. 45-92.

HOFFMAN, K.L.; HAN, I. Y.; DAWSON, P.L. Antimicrobial effects of corn zein films impregnates with nisin, lauric acid, and EDTA. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 6, p. 885-889, 2001.

JANES, M. E.; KOOSHESH, S.; JOHNSON, M.G. Control of *Listeria monocytogenes* on the surface of refrigerated, ready-to-eat chicken coated with edible zein film coatings containing nisin and/or calcium propionate. **Journal of Food Science**, v.67, n.7, p. 2754-2757, 2002.

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

JOFRÉ, A.; GARRIDA, M., AYMERICH,T. Inhibition of Salmonella sp. Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. **Meat Science**, v.78, n.1-2, p. 53-59, jan. 2008.

KIM, Y.M.; PAIK, H.D.; LEE, D.S. Shelf-life characteristic of fresh oysters and ground beef as affected by bacteriocin-coated plastic packaging film. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 998-1002, 2002.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 39-86, 1993.

LEE, C. H.; AN, D. S.; LEE, S. C.; PARK, H. J.; LEE, D. S. A coating for use as an antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nisin and  $\alpha$ -tocopherol. **Journal of Food Engineering**, v. 62, p. 323-329, 2004a.

LEE, C. H.; PARK, H. J.; LEE, D. S. Influence of antimicrobial packaging on kinetics of spoilage microbial growth in milk and orange juice. **Journal of Food Engineering**, v. 65, p. 527-531, 2004b.

LEMAY, M. J.; CHOQUETTE, J.; DELAQUIS, P. J.; GARIÉPY, C.; RODRIGUE, N.; SAUCIER, L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 217-226, 2002.

LÓPEZ-MENDOZA, M.C.; RUIZ, P.; MATA,C.M. Combined effects of nisin, lactic acid and modified atmosphere packaging in raw ground pork: Antimicrobials to control Listeria in meat. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42,n. 5, p. 562-566, may 2007.

LUCHANSKY, J. B. e CALL, J. E. Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared Frankfurters. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 5, p. 1017-1021, 2004.

McCORMICK, K. E.; HAN, I. Y.; ACTON, J. C.; SHELDON, B.W.; DAWSON, P. L. In-package pasteurization combined with biocide-impregnated films to inhibit *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* in turkey bologna. **Journal of Food Science**, v.70, n. 1, p. 52-57, 2005.

MANGALASSARY, S.; HAN, I.; RIECK, J.; ACTON, J.; DAWSON, P. Effect 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, oct. 2008.

MARTINEZ, Y. B.; FERRER, K.; SALAS, E. M. Combined effects of lactic acid and nisin solution in reducing levels of microbiological contamination in red meat carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 11, p. 1780-1783, 2002.

MILLETTE, M.; SMORAGIEWICZ, W.; LACROIX, M. Antimicrobial potencial of immobilized *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 against selected bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p. 1184-1189, 2004.

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, 4 ed., 2001, p. 63-67.

NAKASHIMA, S. M. K. **Aplicação da microbiologia preditiva para modelar o crescimento de bactérias mesófilas e lácticas em salsicha**. São Paulo, 2001. 130p (Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

NASCIMENTO, M.S.; MORENO, I. KUAYE, A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.2, p.120-127, abr./jun.2008

NATIONAL HOT DOG & SAUSAGE CONCIL. Vital Hot Dog Statistics. Disponível em: <http://www.hot-dog.org/ht/d/sp/i/38579/pid/38579> Acesso em: 16 abr 2009.

NATTRESS, F. M.; YOST, C. K.; BAKER, L. P. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 111-119, 2001.

PARENTE, E. e HILL, C. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 73, p. 290-298, 1992.

PEREIRA, D. B. **Estabilidade da nisina durante o armazenamento e seu papel na vida de prateleira de salsichas**. Rio de Janeiro, 2004. 42p (Dissertação de mestrado – Departamento de Tecnologia de Alimentos – UFRRJ).

RAJU, C. V.; SHAMASUNDAR, B. A.; UDUPA, K. S. The use of nisin as a preservative in fish sausage stored at ambient ( $28 \pm 2$  °C) and refrigerated ( $6 \pm 2$  °C) temperatures. **International Journal of Food Science and Tecnology**, v. 38, p. 171-185, 2003.

ROSE, N. L.; PALCIC, M. M.; SPORNS, P.; 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, 2002.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; PASSOS, R. B.; DESTRO, M. T. SHIROSE, I. Estudo da estabilidade de salsicha embalada a vácuo e pasteurizada. **Colet. ITAL**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 184-193, jul. dez. 1990.

SCANNELL, A. G. M.; HILL, C.; BUCKLEY, D. J.; ARENDT, E.K. Determination of the influence of organic acids and nisin on shelf-life and microbiological safety aspects of fresh pork sausage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 407-412, 1997.

SIRAGUSA, G.R.; CUTTER, C.N.; WILLET, J.L. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. **Food Microbiology**, v. 16, p. 229-235, 1999.

SIVAROOBAN, T.; HETTIARACHCHY, N.S.; JOHNSON, M.G. Physical and antimicrobial properties of grape seed extrat, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. **Food Research International**, v. 41, n. 8, p. 781-785, oct. 2008.

SIVAROOBAN, T.; HETTIARACHCHY, N.S.; JOHNSON, M.G. Inhibition of *Listeria monocytogenes* using nisin with grape seed extract on turkey frankfurters stored at 4 and 10°C. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 4, p. 1017-1020, 2007.

SORIANO, A.; ULMER, H. M.; SCANNELL, A. G. M.; ROSS, R. P.; HILL, C.; GARCÍA-RUIZ, A.; ARENDT, E. K. Control of food spoiling bacteria in cooked meat products with nisin, lacticin 3147, and a lacticin 3147-producing starter culture. **European Food Research and Technology**, v. 219, p. 6-13, 2004.

STERGIOU, V. A.; THOMAS, L. V.; ADAMS, M. R. Interactions of nisin with glutathione in a model protein system and meat. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 4, p. 951-956, 2006.

THEIVENDRAN, S.; HETTIARACHCHY, N. S.; JOHNSON, M.G. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin combined with grape seed extract or green tea extract in soy protein film coated on turkey frankfurters. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, p. 39-44, 2006.

YUSTE, J.; PLA, R.; CAPELLAS, M.; MOR-MUR, M. Application of high-pressure processing and nisin to mechanically recovered poultry meat for microbial decontamination. **Food Control**, v.13, p. 451-455, 2002.