

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**ÁCIDOS ORGÂNICOS E SEUS SAIS E NISINA NO  
CONTROLE DE BACTÉRIAS LÁTICAS, AERÓBIAS  
MESÓFILAS E *Listeria monocytogenes* EM  
SALSICHAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Scheila Fernanda Rockembach Zdanski**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

**ÁCIDOS ORGÂNICOS E SEUS SAIS E NISINA NO  
CONTROLE DE BACTÉRIAS LÁTICAS, AERÓBIAS  
MESÓFILAS E *Listeria monocytogenes* EM SALSICHAS**

**Scheila Fernanda Rockembach Zdanski**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**Orientador: Prof. Nelcindo Nascimento Terra**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

A comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ÁCIDOS ORGÂNICOS E SEUS SAIS E NISINA NO CONTROLE DE  
BACTÉRIAS LÁTICAS, AERÓBIAS MESÓFILAS E *Listeria  
monocytogenes* EM SALSICHAS**

elaborada por  
**Scheila Fernanda Rockembach Zdanski**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Leadir Lucy Martins Fries, PhD.**  
(Presidente/ Co-orientadora)

**Alexandre José Cichoski, Dr. (UFSM)**

**Maristela Cortez Sawitzki, Dra. (UNIPAMPA)**

Santa Maria, 29 de agosto de 2011.

*Dedico este trabalho aos meus pais  
Pedro e Maria Lovani, e  
ao meu amor Eder,  
meus grandes incentivadores.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar sempre meus passos e conceder-me forças para superar todos os obstáculos enfrentados na realização deste mestrado.

Ao meu pai, Pedro, por ter sido meu grande incentivador, por despertar em mim sempre a busca pelo saber. Obrigada por toda a ajuda e amor que me deu em todos esses anos de meus estudos.

A minha mãe Maria Lovani, por ter sido minha grande incentivadora, pela companhia nas viagens até Santa Maria, pelos lanches, pelo amor, pelo carinho, pela preocupação constante.

Ao meu grande amor Eder, por ter sido meu grande incentivador, por todo o amor, compreensão e carinho em todos os momentos, pela paciência nas minhas ausências, pela companhia nas viagens a Santa Maria.

A minha irmã Graci, pelo carinho, e por ter me dado a “estrelinha” mais linda, minha sobrinha Giana.

Aos meus sogros, Vilson e Maria de Lurdes e meus cunhados, César, Odair e Micheli, por todo o carinho.

Ao Odair pela ajuda na parte estatística.

A empresa onde realizei meu trabalho, pela oportunidade, compreensão e incentivo. Meu muito obrigado.

Aos meus colegas de trabalho, por toda a ajuda e compreensão dispensada para a realização deste sonho.

Ao Prof. Nelcindo Nascimento Terra, agradeço pelos ensinamentos transmitidos, pela atenção e oportunidade em poder realizar o curso de mestrado.

A Prof.<sup>a</sup> Leadir Lucy Martins Fries, por ter participado da minha banca, na ausência de meu orientador. Obrigado por toda a ajuda, minha eterna gratidão.

Ao Prof. Alexandre José Cichoski, agradeço a valiosa contribuição durante a banca.

A Prof.<sup>a</sup> Maristela Cortez Sawitzki, agradeço pela participação na minha banca e pela valiosa contribuição.

Enfim, agradeço a todos, que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria

### **ÁCIDOS ORGÂNICOS E SEUS SAIS E NISINA NO CONTROLE DE BACTÉRIAS LÁTICAS, AERÓBIAS MESÓFILAS E *Listeria monocytogenes* EM SALSICHAS**

AUTORA: Scheila Fernanda Rockembach Zdanski

ORIENTADOR: Nelcindo Nascimento Terra

CO-ORIENTADORA: Leadir Lucy Martins Fries

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de agosto de 2011.

A salsicha é um produto de elevado consumo, porém devido ao seu processo tecnológico de fabricação, torna-se susceptível a contaminação microbiológica. Garantir a vida útil da salsicha e a sua segurança microbiológica, implica em minimizar níveis de contaminação, limitando ou impedindo o crescimento microbiano. Portanto, o objetivo deste trabalho foi adicionar antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico, e avaliar os efeitos no desenvolvimento das bactérias aeróbias mesófilas, lácticas e da *Listeria monocytogenes* em salsichas embaladas a vácuo, armazenadas a temperatura de 5°C durante o período de armazenamento de 35 dias. Avaliaram-se quatro tratamentos: (T1- 2,5% de solução de lactato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina; T2 - 2,5% de solução de lactato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina seguida de 2,5% de solução de ácido láctico; T3 - 2,5% de solução de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina; T4- 2,5% de solução de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina seguida de 2,5% de solução de ácido láctico) e um controle (não foi adicionado antimicrobianos na formulação e no pós-processamento térmico). Realizaram-se análises microbiológicas (bactérias lácticas, aeróbias mesófilas e *Listeria monocytogenes*) e físico-química (pH). Ao final de 35 dias de armazenamento verificou-se uma sinergia entre os antimicrobianos utilizados na formulação e no pós-tratamento térmico, reduzindo a contagem total de microrganismos mesófilos e bactérias lácticas, em relação ao controle, sendo o (T4), que utilizou na formulação a mistura de lactato de potássio e diacetato de sódio, com a posterior imersão em nisina seguida de ácido láctico o mais eficaz. Os tratamentos em que foram utilizados a nisina (T1 e T3), no pós-tratamento térmico, não foram eficazes no controle de bactérias aeróbias mesófilas e lácticas. A *Listeria monocytogenes*, foi identificada em todas as amostras controle, durante os 35 dias de armazenamento. Porém, os antimicrobianos adicionados na formulação e no pós-tratamento térmico foram eficazes para prevenir o crescimento do patógeno, com exceção do T1. Desta forma a ação sinérgica de antimicrobianos adicionados na formulação, e no pós-processamento térmico são obstáculos que apresentaram um potencial no controle do crescimento de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias lácticas e principalmente capazes de inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* em salsichas embaladas a vácuo e armazenadas a 5°C por 35 dias de armazenamento.

**Palavras-chave:** salsicha; ácidos orgânicos e seus sais; nisina.

## ABSTRACT

Master Dissertation  
Graduate Program in Food Science and Technology  
Federal University of Santa Maria

### **ORGANIC ACIDS AND THEIR SALTS AND NISIN IN CONTROL OF LACTIC ACID BACTERIA, *listeria monocytogenes* AND MESOPHILIC AEROBIC SAUSAGE.**

AUTHOR: Scheila Fernanda Rockembach Zdanski  
ADVISOR: Nelcindo Nascimento Terra  
CO-ADVISOR: Leadir Lucy Martins Fries  
Date and Location of Defense: Santa Maria, August 29, 2011.

The sausage is a product of high consumption, but due to its manufacturing process technology, it becomes susceptible to microbiological contamination. To ensure the life of the sausage and their microbiological safety, means of minimizing contamination levels, limiting or preventing microbial growth. Therefore, the objective of this study was to add antimicrobials in the formulation and post-heat treatment, and evaluate their effects on growth of mesophilic aerobic bacteria, lactic acid bacteria and *Listeria monocytogenes* in sausages vacuum packed, stored at 5 ° C during storage of 35 days. We evaluated four treatments: (T1-2.5% solution of sodium lactate in the formulation and immersion in 200 mg / l of nisin solution, T2 - 2.5% solution of sodium lactate in the formulation and immersion 200 mg / l of nisin solution followed by 2.5% solution of lactic acid, T3 - 2.5% solution of potassium lactate and sodium diacetate in formulation and immersion in 200 mg / l of nisin solution; T4-2.5% solution of potassium lactate and sodium diacetate in formulation and immersion in 200 mg / l of nisin solution followed by 2.5% lactic acid solution) and a control (no antimicrobial was added in formulation and post-thermal processing). There were microbiological (lactic acid bacteria, aerobic mesophilic, and *Listeria monocytogenes*) and physico-chemical (pH). At the end of 35 days storage there was a synergy between antimicrobials used in the formulation and post-heat treatment, reducing the total count of mesophilic and lactic acid bacteria, as compared to control, and the (T4), who used the formulating a mixture of potassium lactate and sodium diacetate, with the subsequent nisin followed by immersion in lactic acid more effective. The treatments that were used nisin (T1 e T3), after the heat treatment, were not effective in controlling aerobic mesophilic and lactic acid bacteria. *Listeria monocytogenes* was identified in all control samples during the 35 days of storage. Thus, the synergistic action of antibiotics added to the formulation, and post-thermal processing are obstacles that had a potential to control the growth of mesophilic aerobic bacteria and lactic acid bacteria and especially able to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed sausages and stored at 5 ° C for 35 days of storage.

**Keywords:** sausage, organic acids and their salts, diacetate, nisin,

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade máxima permitida para cada ingrediente na elaboração da salsicha. ....	15
Tabela 2 – Classificação dos diferentes tipos de salsicha quanto à nomenclatura e composição. ....	16
Tabela 3 – Padrões microbiológicos legais para salsicha. ....	17
Tabela 4 – Tratamentos aplicados a salsicha no presente estudo. ....	34
Tabela 5 – Valores médios e desvio padrão do número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas em salsichas submetidas à adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico, embaladas à vácuo durante o período de armazenamento de 35 dias a temperatura de 5°C. ....	37
Tabela 6 – Valores médios e desvio padrão do número de colônias de bactérias lácticas em salsichas submetidas à adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico, embaladas à vácuo durante o período de armazenamento de 35 dias a temperatura de 5°C. ....	42
Tabela 7 – Ocorrência de <i>Listeria Monocytogenes</i> em salsichas submetidas à adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico, embaladas a vácuo durante o período de armazenamento de 35 dias a temperatura de 5°C. ....	45
Tabela 8 – Valores médios e desvio padrão de pH das salsichas submetidas à adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico, embaladas a vácuo durante o período de armazenamento de 35 dias a temperatura de 5°C. ....	49

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fluxograma do processo de fabricação da salsicha utilizada na empresa em que foi realizado o estudo.....	32
FIGURA 2 – Valores médios e desvio padrão do número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas em salsichas submetidas à adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico, embaladas à vácuo durante o período de armazenamento de 35 dias a temperatura de 5°C.....	38
FIGURA 3 – Valores médios e desvio padrão do número de colônias de bactérias lácticas em salsichas submetidas à adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico, embaladas à vácuo durante o período de armazenamento de 35 dias a temperatura de 5°C.....	43

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Embutidos.....</b>	<b>13</b>
2.1.1 Salsicha.....	14
<b>2.2 Vida de prateleira das salsichas .....</b>	<b>15</b>
2.2.1 Embutidos contaminadas com <i>Listeria monocytogenes</i> .....	20
<b>2.3 Bacteriocinas.....</b>	<b>23</b>
2.3.1 Nisina .....	25
2.3.2 Aplicação de nisina em produtos cárneos .....	26
<b>2.4 Ácidos Orgânicos e seus sais.....</b>	<b>28</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Preparação das salsichas.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2 Análises Microbiológicas .....</b>	<b>33</b>
3.2.1 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas.....	34
3.2.2 Contagem do número de colônias de Bactérias lácticas.....	35
3.2.3 Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	35
<b>3.3 Análise físico-química.....</b>	<b>36</b>
3.3.1 Determinação do pH .....	36
<b>3.4 Análise estatística .....</b>	<b>36</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Análise microbiológica .....</b>	<b>37</b>
4.1.1 Número de colônias de Bactérias Aeróbias Mesófilas .....	37
4.1.2 Número de colônias de Bactérias lácticas.....	41
4.1.3 Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	45
<b>4.2 Análise físico-química.....</b>	<b>48</b>
4.2.1 Determinação do pH .....	48
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>6 SUGESTÕES .....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>53</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Os produtos cárneos de salsicharia ocupam posição de destaque na indústria alimentícia, sendo que no ano de 2010 a venda de salsichas no mercado brasileiro atingiu a faixa de 1,17 bilhões de reais (PARMIGIANI, 2011). Este produto, considerado pronto para o consumo, apresenta um amplo consumo popular, com tendência a um contínuo crescimento, devido à praticidade de preparo e o baixo custo (MARTINS, 2006).

Um aspecto importante a se considerar nos produtos prontos para o consumo é a segurança do alimento no que se refere a sua inocuidade (MARTINS, 2009). A salsicha tem uma vida de prateleira limitada, embora seja submetida ao cozimento durante a sua produção, torna-se um produto altamente manipulado após o cozimento, devido ao seu processo tecnológico de produção (BINGOL; BOSTAN, 2007).

Muitos microrganismos que causam alterações indesejáveis na salsicha podem continuar a sobreviver após o tratamento térmico e multiplicar-se após o armazenamento, sendo que, a contaminação com bactérias lácticas e *Listeria monocytogenes* ocorre principalmente no pós-tratamento térmico (MBANDI; SHELEF, 2002; GEORNARAS et al., 2006).

As bactérias lácticas são identificadas como a maior população deteriorante em produtos embalados à vácuo, desenvolvendo-se facilmente após o seu processamento térmico e sob temperatura de refrigeração, levando a percepção de gosto azedo, exsudado leitoso, produção de limo e inchamento da embalagem (SAMELIS; KAKOURI; REMENTZIS, 2000).

No Brasil, nenhum foco foi relatado, contudo, vários estudos apontam a existência da *Listeria monocytogenes* em produtos prontos para o consumo (FRANCO, 2005; CEZAR, 2008). Pettinati; Telles; Ballian (2006) verificaram a presença de *Listeria monocytogenes* em 218 (55,4%) das 394 amostras de salsichas tipo *hot dog* comercializada na cidade de São Paulo. Lapenda (2010) verificou na cidade do Recife que, entre os embutidos analisados, as salsichas apresentaram os maiores índices de contaminação para *Listeria monocytogenes* com 16,67%. A *Listeria monocytogenes* caracteriza-se por ser patogênica para indivíduos com

algum comprometimento do sistema imunológico, tais como idosos e gestantes, podendo apresentar infecção do sistema nervoso central (JAY, 2005).

Considerando-se a patogenicidade da *Listeria monocytogenes*, bem como a facilidade de sobreviver e se multiplicar em ampla faixa de pH, concentração de sal e temperatura e, a alta ocorrência de bactérias lácticas associadas com produtos embalados a vácuo, faz-se necessário as indústrias produtoras, desenvolver medidas de controle para garantia de atendimento da segurança microbiológica até o final da vida de prateleira do produto (MARTINS, 2009).

Garantir a vida útil dos alimentos e a sua segurança microbiológica, implica em minimizar níveis de contaminação, limitando ou impedindo a taxa de crescimento microbiano (Mc MEEKIN et al., 1987).

Muitas estratégias são adotadas pelas indústrias processadoras de alimentos, e estas têm contribuído para tal finalidade, como a inclusão de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico.

A nisina é um exemplo de antimicrobiano com efeito inibitório sobre vários tipos de bactérias (PERIAGO; MOEZELAR, 2001). É uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis subsp lactis*, que possui ação inibitória comprovada contra bactérias gram-positivas, incluindo *Listeria monocytogenes*. É a única bacteriocina considerada pelo comitê de aditivos de alimentos do *Codex Alimentarius*, da Food and Agriculture Organization (FAO), como GRAS (Generally Recognized as Safe) e tem uso liberado como aditivo alimentar para controle antimicrobiano em cerca de 50 países, sendo a única autorizada no Brasil para utilização na superfície de salsichas (DE MARTINIS, et al., 2001).

Vários trabalhos têm utilizado nisina em produtos cárneos, com o objetivo de inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (GEORNARAS et al., 2006; LÓPEZ-MENDOZA; RUIZ; MATA, 2007; JOFRÉ; GARRIDA; AYMERICH, 2008).

O ácido láctico e seus sais também são agentes antimicrobianos utilizados para o controle de bactérias deteriorantes e patogênicas. São produtos naturais obtidos pela fermentação do açúcar, sendo reconhecido como seguro (GRAS) e também por não afetar as características sensoriais (RODRIGUES, 1998).

A inclusão de ácidos orgânicos e seus sais na formulação de produtos prontos para o consumo têm sido estudados (STEKELEMBRUG, 2003; BARMPALIA et al., 2005; DIEZ et al., 2008).

Outros trabalhos, também mostraram que a utilização em conjunto de antimicrobianos como ácidos orgânicos e seus sais e bacteriocinas aplicados na forma de imersão ou pulverização apresentam um potencial para o controle de *Listeria monocytogenes* e bactérias deteriorantes em produtos cárneos (SAMELIS et al., 2001 e 2005; ISLAM et al., 2002; LU et al., 2005).

Porém poucos estudos avaliaram o efeito da combinação de antimicrobianos na formulação seguido de um pós-tratamento térmico (BARMPALIA et al., 2004; GEORNARAS et al., 2006).

Este tipo de estratégia poderia trazer um sinergismo, de acordo com a teoria dos obstáculos, usando duas ou mais estratégias, cada uma de baixa intensidade, de modo a não afetar as propriedades sensoriais do produto, mas individualmente atacando alvos celulares, que pode levar a morte da célula alvo (LEISTNER; GOULD, 2002).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo, adicionar antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico de salsichas e avaliar os efeitos destes antimicrobianos (ácidos orgânicos e seus sais e nisina) no desenvolvimento das bactérias aeróbias mesófilas, lácticas e da *Listeria monocytogenes* em salsichas embaladas a vácuo, armazenadas a temperatura de 5°C durante o período de armazenamento de 35 dias.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Embutidos

Agregar valor á matéria-prima, esta é a expressão de ordem para a indústria da carne. Em um mercado cada vez mais competitivo e com o aumento da exigência dos consumidores por qualidade, o melhoramento contínuo dos produtos torna-se imperativo para a sobrevivência das empresas no setor. A produção de embutidos apresenta-se como uma das soluções para atender à demanda por qualidade (ODA et al., 2003).

Entendem-se como embutidos, os produtos cárneos processados ou preparados, aqueles em que as propriedades originais da carne fresca foram modificadas através de tratamento físico, químico ou biológico, ou ainda, através da combinação destes métodos. Tais processos visam o prolongamento da vida útil dos produtos, procurando manter as propriedades nutritivas e organolépticas (PARDI et al.,2007). Além disso, visam desenvolver diferentes sabores através de condimentação específica e utilização de diferentes partes do animal de difícil comercialização no estado fresco (TERRA, 2004).

Os embutidos são definidos pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) como todo produto elaborado com carne ou órgãos comestíveis, curados ou não, condimentado, podendo ou não ser cozido, defumado, dessecado, e contido em envoltório natural ou artificial (BRASIL, 1997).

Os embutidos são produtos de grande aceitação no mercado consumidor e representam uma forma saudável e saborosa de ingestão de proteína animal (CALIL et al.,1990). Os embutidos cárneos são produtos alimentícios consumidos em todo o mundo, pois apresenta alta praticidade, diversidade em seu sabor e principalmente baixo custo (DE BARROS, 2009).

Em razão da versatilidade do uso da carne suína na alimentação humana, seja no preparo de cortes *in natura* ou na fabricação de um grande número de embutidos, salgados e defumados, a carne suína continuará ao longo dos anos,

liderando o consumo mundial (FAVERO, 2001). Com a modernização e diversificação da produção nos frigoríficos, houve um aumento no volume de carne embutida (ODA et al.,2003).

O setor de produtos cárneos cresceu muito nos últimos anos com o desenvolvimento de novos produtos, mas os produtos clássicos continuaram sempre no mercado, como: mortadela, lingüiça, salsicha, presunto, apresuntado, salame, hambúrguer, charque, entre outros. O que mudou na verdade foi à variedade de matérias - primas envolvidas, além de novos ingredientes, novos processos, com o objetivo de melhorar a qualidade dos produtos neste setor (SARMENTO, 2006).

### 2.1.1 Salsicha

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Salsicha (BRASIL, 2000), entende-se por salsicha o produto cárneo industrializado, obtido da emulsão de carne de uma ou mais espécies de animais de açougue, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial ou por processo de extrusão, e submetido a um processo térmico adequado. Poderá ter como processo alternativo o tingimento, defumação e a utilização de recheios e molhos. A quantidade máxima permitida para cada ingrediente na elaboração da salsicha é apresentada na tabela 1.

Em 2006, no Brasil, o volume de produção de salsichas nos 81 estabelecimentos produtores, sob controle do Serviço de Inspeção Federal (SIF), foi da ordem de 347 mil toneladas, sendo que os estados brasileiros que lideraram produção foram Santa Catarina, seguido do Rio Grande do Sul e Paraná, totalizando 161.143 toneladas (CEZAR, 2008).

A tabela 2 apresenta a classificação dos diferentes tipos de salsicha quanto à nomenclatura e composição, quanto à porção animal, de diferentes tipos dos produtos denominados “salsicha”, e que são produzidos no Brasil, de acordo com o Regulamento técnico de qualidade de identidade de salsicha (RTQI) (BRASIL, 2000).

Tabela 1 – Quantidade máxima permitida para cada ingrediente na elaboração da salsicha.

<b>Ingredientes</b>	<b>Limite máximo (%)</b>
Carnes (diferentes espécies e CMS)	60
Miúdos comestíveis	10
Proteínas não cárneas	4
Amido	2
Gordura	30
Água	10

Fonte: Instrução Normativa nº 4 (BRASIL, 2000)

## 2.2 Vida de prateleira das salsichas

O termo vida de prateleira é o tempo em que o alimento pode ser conservado em determinadas condições de temperatura, umidade relativa, luz, etc, sofrendo pequenas, mas bem estabelecidas alterações que são até certo ponto, consideradas aceitáveis pelo fabricante, pelo consumidor e pela legislação alimentar vigente (BATTISTELLA, 2008).

Numerosas mudanças ocorrem nos alimentos durante o processamento e a estocagem. É sabido que as condições usadas para o processo e estocagem de alimentos podem influenciar adversamente nos atributos de qualidade. Durante a estocagem, um ou mais atributos de qualidade podem alcançar um estado indesejável, neste instante, o alimento é considerado impróprio para o consumo e isto significa ter alcançado o fim de sua vida de prateleira (MAN; ADRIAN, 2000).

O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), em seu artigo 422, cita: “Devem ser considerados alterados e impróprios para o consumo”: (1) quando a superfície é úmida, pegajosa, exsudando líquido; (2) quando à palpação se verifique partes ou áreas flácidas ou consistência anormal; (3) quando há indício de fermentação pútrida; (4) quando a massa apresenta manchas esverdeadas ou coloração sem uniformidade; (5) quando a gordura está rançosa; (6) quando o envoltório está perfurado por parasitas que atingiram também a massa; (7)

nos casos de odor e sabor estranhos, anormais; (8) quando se constatarem germes patogênicos; e (9) quando manipulados em más condições de higiene (BRASIL, 1997).

Tabela 2 – Classificação dos diferentes tipos de salsicha quanto à nomenclatura e composição.

<b>Denominação do produto</b>	<b>Composição</b>
Salsicha	Carnes de diferentes espécies de animais de açougue, carne mecanicamente separada até o limite máximo de 60%, miúdos comestíveis de diferentes espécies de animais de açougue (estômago, coração, fígado, rim, língua, miolo), tendão, pele e gordura
Salsicha tipo Viena	Carne bovina e ou suína, carne mecanicamente separada até o limite máximo de 40%, miúdos comestíveis de bovino e ou suíno (estômago, coração, fígado, rim, língua, miolo), tendão, pele e gordura
Salsicha tipo Frankfurt	Carne bovina e ou suína, carne mecanicamente separada até o limite máximo de 40%, miúdos comestíveis de bovino e ou suíno (estômago, coração, fígado, rim, língua, miolo), tendão, pele e gordura
Salsicha Frankfurt	Porções musculares de carne bovina e ou suína e gordura
Salsicha Viena	Porções musculares de carne bovina e ou suína e gordura

Fonte: Instrução Normativa nº 4 (BRASIL, 2000)

A carne devido ao seu elevado valor nutricional e à sua grande quantidade de água disponível, torna-se um meio propício ao crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (TERRA, 2004).

A microbiota de salsichas é composta basicamente de microrganismos gram-positivos, como *Micrococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leucoostoc* e também leveduras, mas tem sido relatada, em embutidos, presença de diferentes tipos de patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e outros (BARBUTI; PAROLARI, 2002; JAY, 2005).

Os padrões microbiológicos para alimentos, estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 12 de 02 de janeiro de 2001, estabelecidos para o produto salsicha são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Padrões microbiológicos legais para salsicha.

<b>Microorganismos</b>	<b>Tolerância máxima (UFC/g)</b>
Coliformes a 45°C	1 x10 <sup>3</sup>
<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	3 x10 <sup>3</sup>
<i>Clostridium</i> sulfito redutor a 46°C	5 x10 <sup>2</sup>
<i>Salmonella spp.</i>	Ausência 25g

Fonte: RDC nº 12 ANVISA de 02/01/2001

Na RDC nº 12, para o produto salsicha, não é contemplado limites específicos para *Listeria monocytogenes*. Em função dos riscos inerentes a *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal prontos para o consumo, o Ministério da Agricultura (MAPA) instituiu a Instrução Normativa nº 09, em 08 de abril de 2009, com o objetivo de monitorar e assegurar a inocuidade destes alimentos em estabelecimentos que possuem o Serviço de Inspeção Federal (SIF), o qual estabelece como padrão, ausência em 25 g para *Listeria monocytogenes* nos produtos prontos para o consumo, incluindo a salsicha.

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).

Na unidade industrial, a qualidade microbiológica de produtos processados depende do nível de contaminação inicial, número e tipo de 10, eficiência do método de processamento, controle de temperatura, práticas higiênico-sanitária da planta processadora e conscientização dos funcionários, pois mesmo que o produto passe por um processo de descontaminação, ele pode ser recontaminado pelas mãos dos manipuladores, no fim de seu processo colocando em risco sua inocuidade (MARTINS, 2006).

A qualidade e a vida de prateleira de alimentos geralmente são determinadas pela presença e crescimento de bactérias (WIJZES et al., 2001).

Nos alimentos, a multiplicação ou sobrevivência de microrganismos patogênicos ou deteriorantes é determinada por fatores intrínsecos e extrínsecos que podem atuar como barreiras para multiplicação de microrganismos. O conhecimento e a utilização combinada desses fatores em um alimento formam os fundamentos da teoria dos obstáculos (*hurdle technology*), que permitem controlar a vida de prateleira, a estabilidade microbiológica, bem como, impedir a multiplicação e/ou a produção de toxinas por microrganismos patogênicos eventualmente presentes (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

De acordo com Frazier; Westhoff (1993), nos embutidos os microrganismos que os alteram podem crescer sobre a superfície da tripa, entre a tripa e a carne, ou no seu interior. Várias espécies de bactérias são capazes de se multiplicar no interior dos embutidos durante o período de armazenamento. Os microrganismos e/ou seus produtos metabólicos, em determinadas quantidades, são indicadores da qualidade do alimento e estão diretamente relacionados com o prazo de vida comercial dos mesmos, o que nos permite fazer avaliação da qualidade e previsão do prazo de vida comercial dos alimentos (JAY, 2005).

As bactérias ácido-láticas foram identificadas como a maior população deteriorante em produtos embalados a vácuo, e em atmosfera modificada, além de outros produtos cárneos processados armazenados sob temperatura de refrigeração, influenciando significativamente na qualidade da carne e produtos cárneos e estão associadas com a deterioração destes produtos. Sob condições anaeróbias as bactérias ácidas lácticas podem provocar modificações nos produtos

cárneos com o aumento da acidez, tornando-os mais azedos (ácidos), com exsudados leitosos, promover a perda da coloração e, com a produção de gás, podem ainda provocar inchamento na embalagem (SAMELIS et al., 2000).

Segundo Nicolai et al. (1993), para carnes embaladas à vácuo, a deterioração a temperaturas abaixo de 20°C é dominada pelo crescimento anaeróbio de bactérias ácido lácticas, as quais produzem, na sua maioria, ácido láctico, causando um odor forte após longo tempo de estocagem. Algumas espécies heterofermentativas como os *Lactobacillus viridescens* podem produzir peróxidos que reagem com os pigmentos da carne e causam o esverdeamento (NATTRESS et al., 2001)

As salsichas podem ser incluídas na categoria dos produtos cárneos curados cozidos e prontos para o consumo (*read-to-eat*). Esta classe de produtos não pode ser considerada auto estável, como os enlatados, pois alguns microrganismos sobrevivem ao tratamento térmico normalmente aplicado (TOMPKIN, 2002).

Vermeiren et al. (2004) afirmam que os produtos cárneos cozidos e curados são produtos refrigerados economicamente importantes com um alto consumo em países europeus. Como estes produtos são aquecidos a temperaturas de 65 – 75°C, a maioria das células vegetativas são mortas e a re-contaminação do tratamento pós-aquecimento é que determina a sua vida de prateleira.

De acordo com Franco (2005), os defeitos mais comuns registrados nesses produtos no decorrer da estocagem são:

- Liberação de líquido: resultado do desequilíbrio entre os teores de água, gordura e proteínas solúveis. Esse líquido liberado poderá originar um problema ainda mais grave, isto é, possibilitar o desenvolvimento de microrganismos que irão tornar a salsicha imprópria para o consumo humano.
- Coloração verde: o esverdeamento é o resultado do desenvolvimento de microrganismos que produzem água oxigenada. Essa água oxigenada, ao reagir com os pigmentos da carne produz o pigmento verde responsável por este defeito.
- Quebra de vácuo na embalagem plástica: duas são as possíveis causas desse problema. Uma delas é a ocorrência de microfuros na termosoldagem e a outra é o desenvolvimento de bactérias lácticas heterofermentativas que, ao produzir gás carbônico, provocam a

quebra do vácuo. As bactérias láticas heterofermentativas são resultantes de contaminação de superfícies;

- Estufamento do saco plástico: a produção de gás é o resultado da multiplicação de microrganismos aderidos à superfície da salsicha, face à contaminação.
- Formação de exsudado (viscosidade): é um líquido viscoso formado, geralmente, por bactérias láticas originando uma má impressão do consumidor.

### 2.2.1 Embutidos contaminados com *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria gram-positiva que não forma esporos. Cresce em temperatura de 0 a 45 °C, em pH de 6 a 8, considerada a faixa ótima de crescimento, embora algumas pesquisas tenham demonstrado o seu crescimento em pH de 4,1 a 9,6. Pode crescer em atividade de água  $\geq 0,93$  e resiste bem aos efeitos do congelamento e secagem, ao tratamento com nitrato de sódio (120 mg/kg) e cloreto de sódio (3%), a literatura preconiza que a pasteurização é o suficiente para destruí - lá. (JAY, 2005).

É composta por seis espécies, entre as quais a *Listeria monocytogenes*, é o agente causador da listeriose em homens e animais (SILVA et al., 2004). Pode ser isolada de diversas fontes incluindo solo, silagem, planta processadora de alimentos, carnes cruas e fezes de animais e humanos (BENKERROUM et al. 2005).

Uma importante característica deste patógeno é sua capacidade para multiplicar-se em temperaturas de refrigeração, sobreviver em vários tipos de superfície de contato e, por ser micro-aeróbia ou anaeróbia facultativa, também pode se desenvolver em atmosfera modificada podendo assim proliferar em alimentos mantidos nesta condição (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A *Listeria monocytogenes* caracteriza-se por ser patogênica para indivíduos com algum comprometimento do sistema imunológico, tais como idosos e gestantes, que podem apresentar infecção do sistema nervoso central (JAY, 2005).

Segundo Benkerroum et al.,(2005), a *Listeria monocytogenes* continua comprometendo a segurança dos alimentos, principalmente de alimentos prontos

para o consumo. Este microrganismo é freqüentemente encontrado em carnes e produtos cárneos e embora se apresente, geralmente, em baixas contagens em carnes frescas, à medida que aumenta o seu grau de processamento, o risco de contaminação também é aumentado (CASTELLANO; HOLZAPFRL; VIGNOLO, 2004; JAY, 2005). *Listeria monocytogenes* apresenta alta resistência a ambientes desfavoráveis, e formação de biofilme, fato que constitui um problema para a sua eliminação na indústria alimentícia sendo comum a presença do patógeno no ambiente industrial (CASTELLANO; HOLZAPFRL; VIGNOLO, 2004).

Jay (2005) pesquisando a prevalência de *Listeria spp.* em amostras de carne de diversos países, encontrou uma prevalência global de aproximadamente 20% para este microrganismo em carne suína, 16% em carne bovina e 17% em carne de aves. Mead et al.,(2006) relataram a ocorrência de um surto envolvendo *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos processados que atingiu 108 pessoas nos Estados Unidos, resultando em 14 mortes.

Destro; Kabuki; Serrano (1991) pesquisaram a incidência deste patógeno em carne, lingüiça, salsicha, leite *in natura* e queijo minas frescal, encontrando uma incidência média de 32%, sendo que as amostras de lingüiça foram as que apresentaram a maior incidência do microrganismo (80%) seguidas pelas amostras de salsicha (70%), carne (65%) e queijo minas frescal (10%), no leite nada foi encontrado.

Em seus estudos, Silva et al., (1998), concluem que a *Listeria monocytogenes* é um halo tolerante de altas concentrações de NaCl, sendo capaz de crescer em 10% de NaCl e atividade de água (aw) de 0,93. Algumas linhagens podem tolerar ambientes de 20% de NaCl e de 0,83 de atividade de água. Segundo estes mesmos autores, a *Listeria monocytogenes* em ambientes com 25,5% de NaCl, sobrevive por 132 dias a 4°C, 32 dias a 22°C e 5 dias a 37°C.

Araújo et al., (2002) propõem a tolerância zero para a presença de *Listeria* em alimentos e a rígida adoção de técnicas preventivas de higienização, pois é justamente a capacidade de se sobrepôr às condições ambientais que faz com que a *Listeria monocytogenes* seja atualmente de grande interesse na área de alimentos e explica o destaque que estes microrganismos vêm ocupando na indústria de alimentos, visto as dificuldades de sua eliminação.

Araújo et al., (2002), ressaltam que o aumento de surtos de listeriose humana a partir dos anos oitenta e a possível relação com alimentos contaminados vem

preocupando as autoridades sanitárias. Segundo estes autores, são numerosos os casos individuais esporádicos de listeriose, provocados pela ingestão de produtos tais como, queijo macio, carne de frango mal cozida, salsicha inadequadamente reaquelada.

A emergência de *Listeria monocytogenes* como patógeno alimentar data da década de 1980, com a ocorrência de diversos surtos e casos esporádicos de listeriose em produtos cárneos ligados a mudança de hábitos alimentares, como a maior ingestão de alimentos industrializados e ao consumo de alimentos contaminados (SILVA et al., 2004; JAY, 2005).

No Brasil e em alguns países não existem surtos de listeriose documentados causados por alimentos, entretanto, isto não significa que estejam livres deste problema emergente. O que vem ocorrendo é a sub notificação, uma vez que trabalhos publicados recentemente relatam à presença do microrganismo em alimentos, tornando-se uma preocupação devido à ingestão de produtos de origem animal ser considerada a principal fonte de transmissão para o homem (LOVETT; TWEDT, 1988).

Silva et al., (2004) isolaram *Listeria* spp. em 100% das quarenta e uma amostras de lingüiças mistas do tipo frescal analisadas em Pelotas/RS. Dentre as diferentes espécies, *Listeria innocua* foi isolada com maior freqüência (97,6% das amostras) seguida por *Listeria monocytogenes* (29,3%) e *Listeria welshimeri* (24,4%).

De acordo com os resultados obtidos por Bersot et al., (2001), das trinta amostras de mortadela analisadas, onze (36,7%) foram positivas para *Listeria* spp., sendo oito (26,7%) para *Listeria monocytogenes*.

Comi et al., (1992) encontraram em cento e oitenta e nove amostras de salsichas comercializadas na Itália, vinte e sete (14,2%) amostras contaminadas por *Listeria monocytogenes*.

Mottin et al.,(2006), detectaram 3,99 (13,3%) amostras contaminadas por *Listeria monocytogenes* dos trinta apresuntados de carne suína, fracionados e embalados e prontos para o consumo em Porto Alegre.

A presença de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em salsichas fermentadas na Turquia foi detectado em sessenta e três (21%) e trinta e cinco (11,6%) respectivamente, em estudos de Colak et al.,(2007).

Segundo Barretto et al.,(2001) o maior risco de contaminação com *Listeria monocytogenes* provém da contaminação pós-processamento depois da cocção, quando não observados os cuidados necessários, no que se refere à manipulação de alimentos.

### 2.3 Bacteriocinas

As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas sintetizados no ribossomo e liberados no meio extracelular que apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre bactérias gram-positivas, dentre elas, importantes patógenos de veiculação alimentar como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (HERNÁNDEZ; CARDELL; ZARATE, 2005).

Em geral as bacteriocinas exercem seus efeitos inibitórios pela formação de poros na membrana celular, desestabilizando e alterando a permeabilidade das células sensíveis (LÜCKE, 2000).

A interação entre a bacteriocina e a célula ocorre em dois estágios. O primeiro consiste na adsorção da bacteriocina na membrana celular de uma célula sensível. Nesta etapa, nenhum dano é causado à célula e a adsorção é reversível. No segundo estágio, a bacteriocina causa alterações letais á célula, com danos irreversíveis. Dessa forma, a atividade inibitória desses metabólitos está restrita a bactérias gram-positivas, visto que as bactérias gram-negativas apresentam uma membrana externa impermeável à maioria das moléculas (ABEE; KROCKEL; HILL, 1995).

As diferentes bacteriocinas apresentam variações no espectro de atividade, modo de ação, peso molecular, origem genética e propriedades bioquímicas (DEEGAN et al.,2006).

Hanlin et al., (1993) e Samelis et al., (2005) comentam que existe três limitações para o uso de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas como conservadores em alimentos: não são ativas contra bactérias deteriorantes e patogênicas gram- negativas, bolores e leveduras, não são ativas contra todas as células e ou esporos de bactérias gram- positivas e existem variantes de cepas de

células sensíveis que são resistentes e podem multiplicar-se na presença da bacteriocina.

Segundo Drider et al., (2006), as bacteriocinas estão distribuídas em 3 classes de acordo com suas características bioquímicas e genéticas:

- a) Classe I (lantibióticos): é constituída por peptídeos de baixo peso molecular (19 a 38 resíduos de aminoácidos) que apresentam em sua composição aminoácidos raramente encontrados na natureza como lantionina. A principal representante desta classe é a nisina, produzida por algumas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.
- b) Classe II: é composta por pequenos peptídeos (< 10 kDa) termoestáveis. Geralmente apresentam uma estrutura helicoidal anfifílica, a qual permite sua inserção na célula alvo, promovendo a despolarização da membrana e morte celular (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008). As bacteriocinas pertencentes a esta classe encontram-se subdivididas em: - Classe II a: é composta por bacteriocinas que apresentam alta especificidade contra *Listeria monocytogenes*. Seus representantes possuem 37 a 48 resíduos de aminoácidos. Esta classe também é conhecida por família das pediocinas, porque a pediocina foi a primeira bacteriocina a ser identificada e a mais estudada (AYMERICH; HUGAS; MONFORT, 1998). Estudos têm relatado a inibição de *Listeria monocytogenes* por pediocina ou pela utilização de culturas produtoras de pediocina em embutidos fermentados (CAPLICE; FITZGERALD, 1999). - Classe II b: é constituída por bacteriocinas que requerem a atividade combinada de dois peptídeos, com um mecanismo de ação que envolve a dissipação do potencial de membrana e diminuição da concentração intracelular de ATP. Estes peptídeos apresentam atividade bacteriocinogênica muito baixa se forem empregados individualmente (COTTER; HILL; ROSS, 2005). Classe II c: as bacteriocinas pertencentes a esta classe apresentam uma união covalente das terminações C e N, resultando em uma estrutura cíclica. São representantes desta classe: a enterocina AS-48, a circularina A e a reutericina (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008).
- c) Classe III: esta classe é composta por grandes proteínas (> 30 kDa) que são sensíveis ao tratamento térmico (60-100°C por 15 minutos) e complexas quanto à atividade e à estrutura protéica. O mecanismo de

ação destas bacteriocinas se diferencia das demais classes por promover a lise celular através da lise da parede celular do micro-organismo alvo (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

Em geral, para que uma bacteriocina possa ser empregada na indústria de alimentos deve cumprir alguns requisitos como: a linhagem produtora deve ter status GRAS, a bacteriocina deve apresentar amplo espectro de inibição sobre os principais patógenos de alimentos ou ser altamente específica sobre algum deles, deve ser termoestável, não pode apresentar risco à saúde do consumidor, deve ter efeito benéfico sobre o produto, aumentando sua segurança, sem afetar a qualidade nutricional e sensorial (HOLZAPFEL; GEINSEN; SCHILLINGER, 1995).

### 2.3.1 Nisina

A nisina é um polipeptídeo produzida por certas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. Foi descoberta na Inglaterra em 1928, durante observação do metabolismo de uma linhagem especial de *Streptococcus lactis* (atualmente reclassificado como *Lactococcus lactis*) que apresenta inibição sobre certas bactérias lácticas (McAULIFFE; ROSS; HILL, 2001).

Em 1969 a nisina foi aprovada pela FAO (Food and Agriculture Organization) e pela WHO (World Health Organization) como aditivo em alimentos. (DE MARTINIS et al., 2002). Cerca de 50 países permitem o uso de nisina em alimentos em maior ou menor grau. No Brasil a aplicação de nisina é permitida em queijos pasteurizados na concentração máxima de 12,5 mg/Kg na massa (BRASIL, 1996). Em 1998 o MAPA, autorizou a utilização do produto comercial Nisaplin (200 ppm de nisina em solução de ácido fosfórico), na superfície externa de salsichas (CASTRO, 2002).

Recentemente foi verificada que a nisina apresenta duplo modo de ação: I) impede a síntese do peptidoglicano na parede celular, neste processo a nisina se liga ao lipídeo II da membrana celular, responsável pelo transporte de peptidoglicano 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 (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

A nisina apresenta ação antimicrobiana sobre vários microrganismos gram-positivos, mas não é eficaz contra gram-negativos, leveduras e bolores (FRANCO; DE MARTINIS; ALVES, 2006). Sua atividade já foi demonstrada sobre *Listeria monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus curvatus* entre outros (LEE et al., 2004; COOKSEY, 2005; HAMPIKYAN;UGUR, 2007).

A nisina é mais solúvel em substrato ácido e torna-se menos solúvel em pH próximos da neutralidade. 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. (DELVES-BROUGHTON, 2005).

### 2.3.2 Aplicação de nisina em produtos cárneos

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 (DE BARROS, 2009). Em salsichas cozidas tipo continental embalada a vácuo e armazenada 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).

Pereira, (2004) avaliou a influencia da nisina em salsichas, 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  $10^6$  UI/g. As salsichas foram tratadas com adição de nisina na massa na concentração de 200UI/g e 500UI/g e ou por imersão em solução de ácido fosfórico 0,1%, contendo 200UI/g e 500UI/g. 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 á vida de prateleira das salsichas.

De Barros, (2009) observou que a aplicação conjunta de nisina e ácido fosfórico na etapa de hidratação da tripa, somando ao armazenamento em baixa temperatura (4°C) são obstáculos que apresentam potencial no controle do crescimento de bactérias lácticas em salsichas.

A inibição de *Listeria monocytogenes* ( $10^6$  UFC/g) também foi verificada em salsichas fermentadas típicas da Turquia, durante 20 e 25 dias quando foi utilizada nisina na concentração de 50 e 100 UI/g respectivamente (HAMPIKYAN; UGUR, 2007).

Embora muitos resultados comprovem benefícios do uso de nisina como conservante em produtos cárneos, sua aplicação tem apresentado<sup>30</sup> 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.

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 de ácidos orgânicos, adição de outra bacteriocina ou a adição de outros conservantes naturais. (DE BARROS, 20<sup>31</sup>

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 (500 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.

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

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 Ácidos orgânicos e seus sais

O lactato de sódio e potássio são amplamente utilizados na indústria cárnea para melhorar a segurança alimentar e estender a vida de prateleira de produtos cárneos. O mecanismo específico antimicrobiano é bastante complexo. Em primeiro lugar o lactato diminui a atividade de água, que é um parâmetro importante no controle do crescimento microbiano. Além disso, o lactato apresenta específica atividade antimicrobiana, o chamado efeito do íon lactato. Esta atividade é devido ao fato de que na solução existe um equilíbrio entre as formas dissociadas e não dissociadas. A forma não dissociada é capaz de passar facilmente através da membrana celular e dissociar-se dentro dela e conseqüentemente acidificar o seu interior, provocando até a morte do microrganismo (FERREIRA, 1999).

O ácido láctico é um ácido orgânico comestível que tem características semelhantes ao sal comum, com exceção ao que se refere ao sabor. O seu uso é apreciado na alimentação pelo seu sabor ácido e por não mascarar outros componentes (PARDI et al.,2007). A temperatura ambiente, o ácido láctico é um líquido incolor ou ligeiramente amarelado, miscível com água em todas as proporções. Grande parte de sua atividade antimicrobiana é devida a queda do pH que ele provoca. Lactato de sódio e potássio podem ser utilizados em produtos cárneos em níveis variando em 2 e 4% sem interferir negativamente na qualidade sensorial ( STEKELENBURG, 2003).

Um desenvolvimento bastante novo nesse campo é o uso de uma combinação de lactato de sódio ou de potássio e de diacetato de sódio. Como os lactatos, o diacetato de sódio é um (GRAS) substância segura e já utilizado em alimentos para controle de pH e como agente antimicrobiano (KALINOWSKI ; TOMPKIN 1999).

Usando combinações de lactatos com diacetato de sódio três obstáculos adicionais são incorporados em produtos cárneos. A combinação reduz a atividade de água do produto e é composto por dois ingredientes antimicrobianos: ácido láctico e ácido acético. Stekelenburg (2003) já mostravam a vantagem do uso de uma combinação de lactato e diacetato de em salsicha e presunto cozido para inibir a desenvolvimento de *Listeria monocytogene* e outros patógenos (MBANDI; SHELEF, 2002; BARMPALIA et al.,2005).

Os ácidos orgânicos são bacteriostáticos mais eficientes, normalmente, a baixas temperaturas. O ácido láctico, produto característico da fermentação por bactérias lácticas, pode reduzir o pH em níveis em que o desenvolvimento de microorganismos deteriorantes (*Pseudomonas*), patogênicos (*Salmonella*) e toxigênicos (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*) é inibido (HOLZAPFEL; GEINSEN; SCHILLINGER, 1995).

Sua ação antibacteriana é, sobretudo, em relação aos anaeróbios. O ácido láctico é muito estável em relação ao calor, resistindo a temperaturas elevadas. O ácido láctico atua sobre um variado espectro de microrganismos, possibilitando um controle microbiológico, não só durante a fase de processamento, como também durante a fase de distribuição e comercialização do produto. Desta forma, podemos dizer que o ácido láctico é possuidor tanto de um efeito bacteriostático quanto bactericida. O aumento de vida de prateleira usualmente observados com adição de 1,8% está entre 50 a 110% em produtos cozidos (FERREIRA, 1999).

A natureza lipofílica dos ácidos não dissociados permite a difusão pela membrana celular, causando desnaturação crescente da membrana e das enzimas de transporte (AMMOR; MAYO, 2007).

Diante do exposto nesta revisão bibliográfica, a contaminação por bactérias aeróbias mesófilas, bactérias lácticas e *Listeria monocytogenes* adquiridos durante o processo de produção de salsichas pode ser controlado, através da aplicação da teoria dos obstáculos, usando duas ou mais estratégias, cada uma de baixa intensidade, de modo a não afetar as propriedades sensoriais do produto, mas individualmente atacando alvos celulares, que pode levar a morte da célula alvo (LEISTNER & GOULD, 2002).

A inclusão de ácidos orgânicos e seus sais na formulação de produtos prontos para o consumo têm sido estudados e tem sido eficaz (STEKELEMBRUG, 2003; BARMPALIA et al., 2005; DIEZ et al., 2008).

Outros trabalhos, também mostraram que a utilização em conjunto de antimicrobianos como ácidos orgânicos e seus sais e bacteriocinas aplicados na forma de imersão ou pulverização apresentam um potencial para o controle de *Listeria monocytogenes* e bactérias deteriorantes em produtos cárneos (SAMELIS et al., 2001 e 2005; ISLAM et al., 2002; LU et al., 2005).

Porém poucos estudos avaliaram o efeito da combinação de antimicrobianos na formulação seguido de um pós-tratamento térmico (BARMPALIA et al., 2004; GEORNARAS et al.,2006).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Preparação das salsichas

As salsichas foram elaboradas em uma indústria Frigorífica, sob regime de fiscalização SIF, localizada no estado do Rio Grande do Sul. A indústria, onde foi realizado o estudo, possui implantado na linha de produção da salsicha, ferramentas da qualidade, como BPF (Boas práticas de fabricação), APPCC (Análises de perigos e pontos críticos de controle) e PPHO (Procedimento padrão de higiene operacional).

Para a elaboração da salsicha foi utilizada a seguinte formulação sugerida por Terra (1998) com adaptações da indústria: Carne mecanicamente separada de aves (CMS), (44%), água (12%), carne bovina (15%), carne suína (13%), emulsão de pele (6,5%), proteína texturizada de soja (PTS) (5%), fécula (1,9%), sal (1%), condimento de salsicha (0,8%), açúcar (0,25%), eritorbato de sódio (0,2%), polifostato de sódio (0,2%), nitrito e nitrato de sódio (0,1%) e corante (0,05%).

O fluxograma do processo de fabricação da salsicha utilizada na empresa em que foi realizado o estudo está apresentado na figura 1.

A elaboração das salsichas iniciou-se com a moagem da carne suína e bovina, o CMS foi triturado no quebrador de blocos. Posteriormente as matérias-primas cárneas foram levadas para o *cutter* e adicionadas dos demais ingredientes até a formação de uma massa homogênea. A massa obtida foi dividida em três lotes de 10 kg cada. Em dois lotes, foi acrescentada, uma quantidade pré-definida de sais de ácidos orgânicos e misturado por mais um minuto no *cutter*.

A um lote de massa foi adicionado 2,5% de solução de lactato de sódio e em outro lote foi adicionado uma mistura de 2,5% de solução de lactato de potássio e diacetato de sódio. A solução de lactato de potássio e diacetato de sódio possuem uma concentração de 56% de lactato de potássio e 4% de diacetato de sódio. A solução de lactato de sódio possui uma concentração de 60% de lactato de sódio. No lote controle não foi adicionado sais de ácidos orgânicos na formulação.

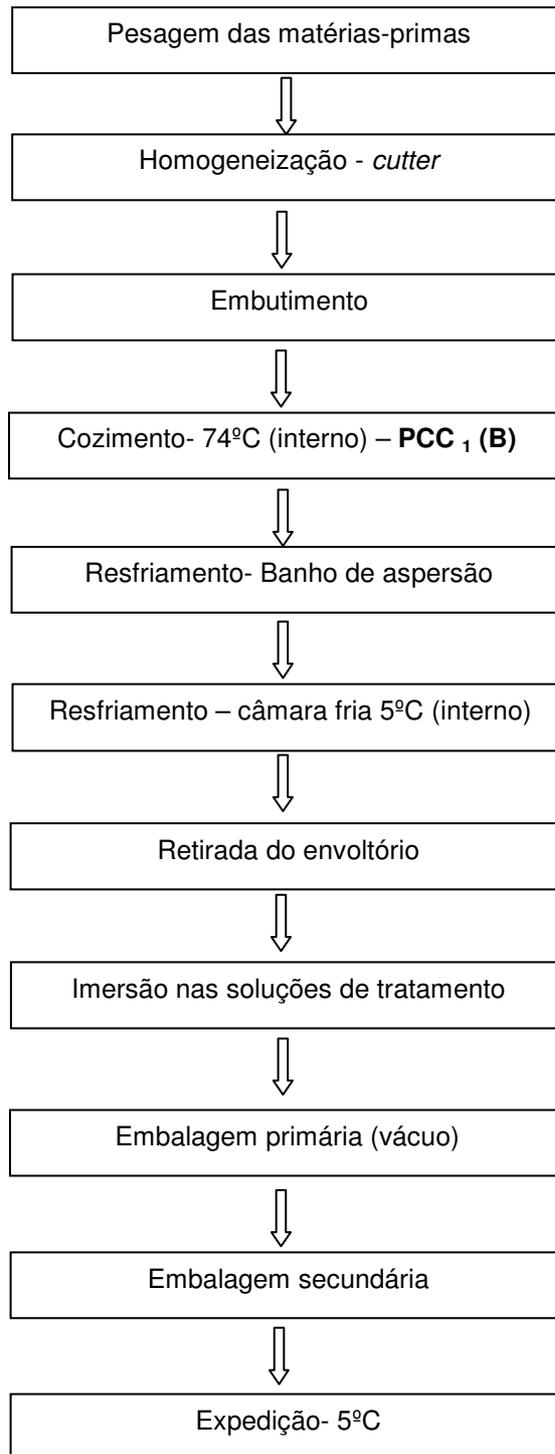


Figura 1 – Fluxograma do processo de fabricação da salsicha utilizada na empresa em que foi realizado o estudo.

Após, os lotes de massa obtidos, foram levadas a sala de embutimento, onde foram embutidas em tripa artificial de colágeno com a ajuda da embutideira. Em seguida, foram encaminhadas a estufa para o cozimento até atingir temperatura interna de  $\geq 74^{\circ}\text{C}$ , o que resultou em torno de 4 a 5 horas. As salsichas cozidas

foram resfriadas em água potável a temperatura de 15°C através de chuveiros de aspersão por 15 minutos, e posteriormente armazenadas em câmara fria a temperatura de 0° C por 4 horas, até a salsicha atingir a temperatura interna de  $\leq 5^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente as salsichas foram direcionadas a sala de retirada de embalagem, onde foram removidas manualmente as tripas de colágeno. Após a remoção das tripas de colágeno, os lotes de salsichas produzidos foram imersos por 2 minutos em diferentes soluções de antimicrobianos, a temperatura de 0°C, gerando os tratamentos apresentados na tabela 4. Para os tratamentos T2 e T4, após os 2 minutos de imersão na primeira solução (nisina), as salsichas foram removidas do banho, deixando escorrer a solução por 1 minuto, sendo posteriormente imersa na outra solução proposta para os tratamentos (ácido láctico). Após os tratamentos de imersão, deixou-se escorrer por cerca de 1 minuto a solução das salsichas, antes de serem embaladas manualmente a vácuo e armazenadas a temperatura de 5°C. As soluções foram preparadas em água destilada a 0°C, exceto para a solução de nisina que foi preparada com ácido fosfórico 0,1% grau alimentício, mas também a 0°C. Os valores de pH das soluções de imersão foram: 3,0 para a solução de nisina e de 2,30 para solução de ácido láctico.

A Nisina utilizada neste experimento possui uma concentração de 200 mg/L. Está concentração utilizada foi baseada nos estudos de Castro ( 2002) .Os demais antimicrobianos utilizados neste estudo foram utilizados baseado no estudo realizado por Geornaras et al.,( 2006).

### **3.2 Análises Microbiológicas**

A análise microbiológica constou da determinação da contagem do número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas, lácticas e da pesquisa de *Listeria monocytogenes*, nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35 do período de armazenamento da salsicha a temperatura de 5°C. Uma unidade analítica de 25 g foi retirada assepticamente de cada amostra das salsichas e homogeneizadas com 225 ml de água peptonada a 0,1% em saco estéril. A amostra foi homogeneizada em Stomacher 400 (Seward Medical) por 1 minuto e diluições decimais seriadas foram

realizadas em água peptonada 0,1%. Essas análises foram realizadas em duplicata, com exceção da pesquisa de *Listeria monocytogenes* que foi analisada somente uma amostra de salsicha de cada tratamento, mais o controle, para cada dia de armazenamento.

Tabela 4 – Tratamentos aplicados a salsicha no presente estudo.

<b>Tratamentos</b>	<b>Formulação</b>	<b>Pós-tratamento térmico</b>
<b>C</b>	sem antimicrobiano	sem antimicrobiano
<b>T1</b>	2,5% de solução de lactato de sódio	200 mg/L de solução de nisina
<b>T2</b>	2,5% de solução de lactato de sódio	200 mg/L de solução de nisina, seguida de imersão em 2,5% de solução de ácido láctico
<b>T3</b>	2,5% solução de lactato de potássio e diacetato de sódio	200 mg/L de solução de nisina
<b>T4</b>	2,5% solução de lactato de potássio e diacetato de sódio	200 mg/L de solução de nisina, seguida de imersão em 2,5% de solução de ácido láctico

### 3.2.1 Contagem do número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas

A partir das diluições decimais seriadas, alíquotas de 1 ml de cada diluição foram transferidas para placas de petri. A seguir, foram adicionados cerca de 20 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 por 48 horas, conforme metodologia descrita por BRASIL (2003). O número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado nas placas de diluições adequadas e os resultados expressos em  $\log_{10}$  UFC/g.

### 3.2.2 Contagem do número de colônias de bactérias lácticas

A partir das diluições decimais seriadas, alíquotas de 1 ml de diluições foram transferidas para placas de petri. A seguir, adicionou-se cerca de 20 ml de Agar De Man,Rogosa e Sharpe (MRS-Merck) previamente fundido e resfriado a 45°C. Após homogeneização e completa solidificação do meio de cultura, as placas foram incubadas a 30°C, por 48 horas em jarra de anaerobiose (Oxoid) com sistema de exaustão de oxigênio (Anaerogen – Oxoid), conforme metodologia proposta por (De BARROS, 2009). O número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado nas placas de diluições adequadas e os resultados expressos em  $\log_{10}$  UFC/g.

### 3.2.3 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi seguida a metodologia proposta de acordo com Lapenda (2010), através do método VIDAS.

As amostras foram homogeneizadas usando duplo enriquecimento, inicialmente com Caldo LX (enriquecimento primário) em *Stomacher* e incubadas a 30°C + 1°C por 24h e posteriormente, foram aliquotadas 0,1ml das amostras para tubos com Caldo LX (enriquecimento secundário) e incubadas a 30°C + 1°C por 24h. Em seguida, foi retirada alíquota de 2ml da amostra em caldo LX para aquecimento a 95°C por 5 minutos; e posteriormente, 0,5ml de cada amostra foi inoculado no “barrete” e colocado no equipamento mini VIDAS® para realização do ensaio, que tem duração de 127 minutos, ocorrendo, ao término, a impressão do resultado.

Os resultados foram interpretados como ausência e ou presença de *Listéria monocytogenes*.

### **3.3 Análise físico-química**

A análise físico-químicas de pH foi realizada em triplicata no dia 0, 7, 14, 21,28 e 35 dias de armazenamento da salsicha a temperatura de 5°C.

#### **3.3.1 Determinação do pH**

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro (Testo 205), de acordo com a metodologia proposta por TERRA & BRUM (1988).

### **3.4 Análise estatística**

Os dados das análises microbiológicas (bactérias aeróbias mesófilas e lácticas) foram coletados em duplicata, sendo que cada amostra foi inoculada em duas placas, totalizando 4 contagens. As determinações físico-químicas de pH foram realizadas em triplicata. Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de Variância (ANOVA), sendo que as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey*, considerando o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) através do programa de estatístico Bioestatic. 5.0.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análises microbiológicas

#### 4.1.1 Número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas

A tabela 5 apresenta os valores médios e o desvio padrão do número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas em salsichas, submetidas à adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico, embaladas à vácuo durante o período de armazenamento de 35 dias a temperatura de 5°C. Os resultados sugerem que a contagem total de bactérias aeróbias mesófilas seja decorrente da multiplicação das bactérias lácticas (tabela 6), pois, os valores dos ensaios microbiológicos seguem uma tendência, ou seja, tendem a um mesmo comportamento.

Tabela 5 – Valores médios e desvio padrão do número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas em salsichas submetidas à adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico, embaladas à vácuo durante o período de armazenamento de 35 dias a temperatura de 5°C.

	Dias de armazenamento					
	0	7	14	21	28	35
<b>C</b>	3,5 ± 0,20 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,45 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,51 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,40 <sup>a</sup>	6,85 ± 0,37 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,50 <sup>a</sup>
<b>T1</b>	2,9 ± 0,31 <sup>b</sup>	3,0 ± 0,39 <sup>b</sup>	4,0 ± 0,37 <sup>b</sup>	4,8 ± 0,11 <sup>b</sup>	5,5 ± 0,25 <sup>b</sup>	6,5 ± 0,50 <sup>a</sup>
<b>T2</b>	2,48 ± 0,58 <sup>c</sup>	2,5 ± 0,25 <sup>b</sup>	3,50 ± 0,40 <sup>c</sup>	4,0 ± 0,18 <sup>c</sup>	4,2 ± 0,25 <sup>c</sup>	4,5 ± 0,3 <sup>b</sup>
<b>T3</b>	2,6 ± 0,45 <sup>b</sup>	2,7 ± 0,31 <sup>b</sup>	3,9 ± 0,21 <sup>b</sup>	4,5 ± 0,30 <sup>b</sup>	5,0 ± 0,29 <sup>b</sup>	6,0 ± 0,5 <sup>a</sup>
<b>T4</b>	2,15 ± 0,50 <sup>d</sup>	2,2 ± 0,40 <sup>c</sup>	3,0 ± 0,35 <sup>d</sup>	3,3 ± 0,27 <sup>d</sup>	3,4 ± 0,27 <sup>d</sup>	3,5 ± 0,25 <sup>c</sup>

Médias acompanhadas por letras diferentes na mesma coluna e no mesmo dia apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. C: controle (sem adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico); T1: 2,5% de solução de lactato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina; T2: 2,5% de solução de lactato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina seguida de 2,5% de solução de ácido láctico; T3: 2,5% de solução de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina; T4: 2,5% de solução de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina seguida de 2,5% de solução de ácido láctico.

Observa-se que os valores das contagens do dia zero (0) em todos os tratamentos foram significativamente ( $p < 0,05$ ) menores do que a amostra controle. Até o sétimo dia de armazenamento, o crescimento do número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas, manteve-se praticamente inalterado em relação ao dia zero, com exceção do controle, como pode ser visto na figura 2.

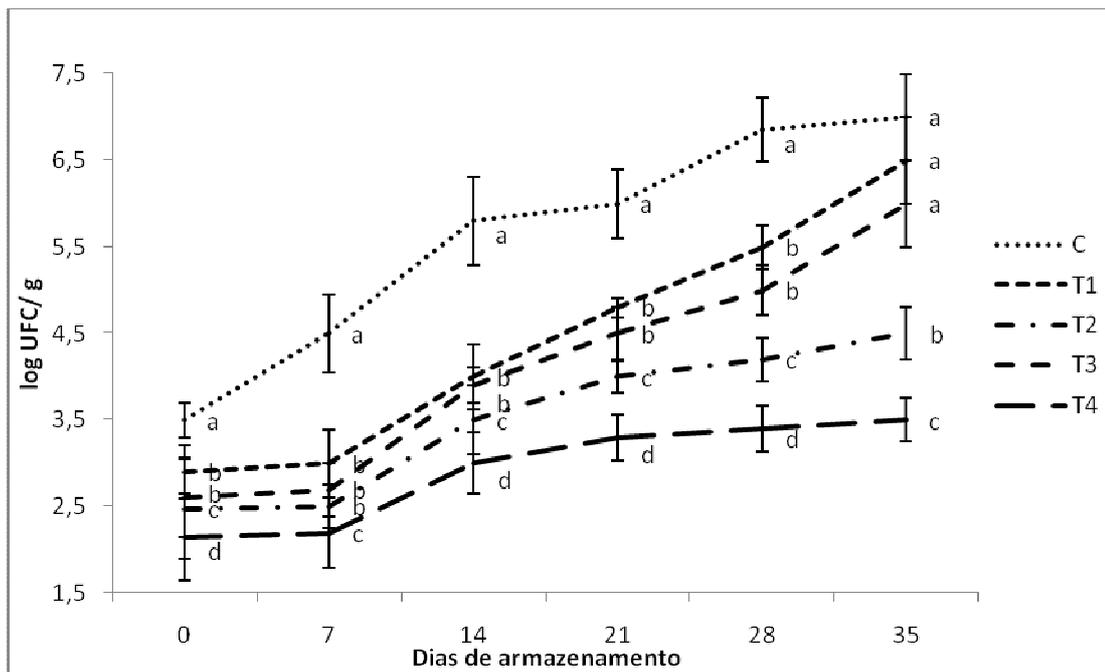


Figura 2 – Valores médios e desvio padrão do número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas em salsichas submetidas à adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico, embaladas à vácuo durante o período de armazenamento de 35 dias a temperatura de 5°C.

Sendo:

C: controle (sem adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico); T1: 2,5% de solução de lactato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina; T2: 2,5% de solução de lactato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina seguida de 2,5% de solução de ácido láctico; T3: 2,5% de solução de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina; T4: 2,5% de solução de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina seguida de 2,5% de solução de ácido láctico

Tais resultados mostram uma sinergia inicial entre os antimicrobianos adicionados na formulação e no pós-tratamento térmico. Essa redução inicial, observada nos tratamentos T1, T2, T3 e T4, em relação ao controle, sugerem uma

ação bactericida tanto dos sais de ácidos orgânicos adicionados na formulação como também uma ação bactericida da nisina sozinha ou em seqüência com o ácido láctico no pós-tratamento térmico, pois, de acordo com Stekelenburg (2003), os íons lactato apresentam tanto um efeito bacteriostático como bactericida devido a sua capacidade de provocar um desequilíbrio celular, reduzindo o pH e retardando o crescimento celular e, em alguns casos até levando a morte dos microrganismos, e, de acordo com Lucke (2000) a nisina exerce seu efeito inibitório pela formação de poros na membrana celular, desestabilizando e alterando a permeabilidade das células sensíveis.

Porém, este efeito bactericida foi verificado somente até o sétimo dia de armazenamento. No 14<sup>o</sup> dia de armazenamento observou-se um crescimento no número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas, para todos os tratamentos, seguindo esta tendência até o final do período de armazenamento.

No entanto, verificou-se que, os tratamentos T2 e T4 apresentaram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, após 35 dias de armazenamento em relação ao controle (figura 2).

Esses resultados estão de acordo com Martinez et al.,(2002), que verificaram que, a aplicação conjunta de nisina e ácido láctico apresentou maior eficiência na redução de bactérias aeróbias mesófilas que a adição dos compostos separadamente, quando utilizado na superfície de carcaças bovina, confirmando desta forma, a ação sinérgica entre o ácido láctico e a nisina. 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; LOPEZ-MENDOZA;RUIZ;MATA, 2007).

Porém, os tratamentos T2 e T4 apresentaram entre si diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ), onde o banho de imersão em nisina seguida de ácido láctico foi mais eficaz quando foi utilizada na formulação da salsicha a mistura de lactato de potássio com diacetato de sódio (T4), obtendo as maiores redução no número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas,  $3,5 \log_{10}$  UFC/g em comparação com  $2,5 \log_{10}$ UFC/g do tratamento T2, após 35 dias de armazenamento em relação ao controle. Este resultado pode estar relacionado à mistura de lactato de potássio com diacetato de sódio conter dois ingredientes antimicrobianos: ácido láctico e ácido acético (STEKELENBURG, 2003).

Resultados semelhantes a este trabalho foram encontrados por Mbandie e Shelef, (2002) que mostraram que a combinação de lactato e diacetato de sódio apresentou o maior efeito se comparado a adição somente de lactato de sódio na redução de bactérias aeróbias mesófilas, quando aplicado na superfície de carcaça bovina. Diferentemente, Diez et al.,(2008), utilizando a mesma concentração utilizada neste estudo, da mistura de lactato de potássio e diacetato de sódio em lingüiça cozida (chouriço), não apresentou um efeito significativo na redução das bactérias aeróbias mesófilas, porém nesse estudo, os referidos antimicrobianos só foram adicionados na massa, não sofrendo nenhum tratamento no pós-processamento térmico, sendo que as bactérias deteriorantes crescem principalmente na superfície do produto.

Os tratamentos T1 e T3 apresentaram respectivamente 0,5 e 1  $\log_{10}$  UFC/g de redução no crescimento do número de colônias de bactérias aeróbias mesófilas, em relação ao controle após 35 dias de armazenamento, não apresentando uma redução significativa ( $p < 0,05$ ). Também, não houve diferença estatística entre os tratamentos T1 e T3, mostrando que a imersão em nisina, no pós-tratamento térmico não apresentou diferenças quanto ao antimicrobiano adicionado na formulação. Sugerindo desta forma, que esses tratamentos apresentaram somente um efeito bacteriostático (em relação ao dia 0), mas não bactericida, pois ao final do período de armazenamento as contagens foram próximas ao controle.

A incapacidade da nisina em manter a sua atividade durante o armazenamento está na quantidade insuficiente de nisina, para agir com todas as células-alvo, a inativação por componentes alimentares, o desenvolvimento de microrganismos resistentes a nisina e, demonstrando também, que a nisina não é efetiva para todo o grupo de bactéria gram-positiva (MURIANA, 1996). Confirmando que o efeito da nisina precisa ser reforçado pela combinação com outros tratamentos, como os antimicrobianos, utilizados no tratamento T4.

Resultados deste trabalho, estão de acordo com Castro (2002), que 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 a temperaturas de 8º ou 12º C. Pereira (2004) também não observou atividade antimicrobiana da nisina sobre bactérias mesófilas, em salsichas imersas nesta solução.

Como a legislação, RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA, não apresenta padrões microbiológicos de bactérias aeróbias mesófilas para a salsicha, foi considerado como limite o valor de  $\leq 4 \log_{10}$  UFC/g, adotado pela empresa, para verificar o final da vida de prateleira. Assim, a amostra controle, no sétimo dia, já não estava dentro dos padrões microbiológicos estipulados para tal produto, sendo considerada inadequada para o consumo, do ponto de vista microbiológico. O tratamento T1 e T3 apresentaram uma vida de prateleira de somente 14 dias, mas acrescentaram ao produto 7 dias a mais na vida de prateleira em relação ao controle. O tratamento T2 apresentou uma vida de prateleira de 21 dias acrescentaram ao produto 14 dias a mais na vida de prateleira em relação ao controle. Porém o tratamento T4, no final da vida de prateleira estipuladora pela indústria, não atingiu o valor de  $\leq 4 \log_{10}$  UFC/g, sendo assegurada a sua qualidade em termos microbiológicos, acrescentando 28 dias a mais na vida de prateleira da salsicha em relação ao controle. Esses resultados mostraram que as salsichas submetidas ao tratamento T4, apresentaram uma maior vida útil comparada aos outros tratamentos utilizados neste estudo (T1, T2 e T3), quando considerado os microrganismos aeróbios mesófilos, sugerindo-se, portanto, um aumento para a vida útil da salsicha além da proposta pela empresa.

#### 4.1.2 Número de colônias de bactérias lácticas

A tabela 6 apresenta os valores médios e o desvio padrão do número de colônias de bactérias lácticas em salsichas, submetidas à adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico, embaladas à vácuo durante o período de armazenamento de 35 dias a temperatura de 5°C.

Observa-se que os valores das contagens do dia zero (0) em todos os tratamentos foram significativamente ( $p < 0,05$ ) menores do que a amostra controle. Até o sétimo dia de armazenamento, o crescimento do número de colônias de bactérias lácticas, manteve-se praticamente inalterado em relação ao dia zero, com exceção do controle, semelhantemente ao comportamento dos microrganismos aeróbios mesófilos, sugerindo as mesmas razões para tal comportamento. Tais

resultados mostraram uma sinergia inicial entre antimicrobianos adicionados na formulação e no pós-tratamento térmico, também para as bactérias lácticas.

Semelhante ao comportamento dos microrganismos aeróbios mesófilos, este efeito bactericida, foi verificado somente até o sétimo dia de armazenamento, como pode ser verificado na figura 3. No 14º dia de armazenamento observou-se um crescimento no número de colônias de bactérias lácticas, para todos os tratamentos, seguindo esta tendência até o final do período de armazenamento.

Verificou-se que, os tratamentos T2 e T4 apresentaram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no número de bactérias lácticas, após 35 dias de armazenamento em relação ao controle, semelhante aos microrganismos aeróbios mesófilos. Porém, os tratamentos T2 e T4 apresentaram entre si diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ), onde o banho de imersão em nisina seguida de ácido láctico foi mais eficaz quando utilizada na formulação da salsicha a mistura de lactato de potássio com diacetato de sódio (T4), obtendo as maiores redução no número de colônias de bactérias lácticas, 4,5  $\log_{10}$  UFC/g em comparação com 3,2  $\log_{10}$  UFC/g do tratamento T2 após 35 dias de armazenamento em relação ao controle, semelhante aos resultados para microrganismos aeróbios mesófilos.

Tabela 6 – Valores médios e desvio padrão do número de colônias de bactérias lácticas em salsichas submetidas à adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico, embaladas à vácuo durante o período de armazenamento de 35 dias a temperatura de 5°C.

	Dias de armazenamento					
	0	7	14	21	28	35
<b>C</b>	3,8 ± 0,50 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,29 <sup>a</sup>	5,1 ± 0,44 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,90 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,33 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,78 <sup>a</sup>
<b>T1</b>	2,7 ± 0,11 <sup>b</sup>	3,0 ± 0,33 <sup>b</sup>	3,7 ± 0,30 <sup>b</sup>	4,0 ± 0,41 <sup>b</sup>	5,0 ± 0,45 <sup>b</sup>	6,6 ± 0,26 <sup>a</sup>
<b>T2</b>	2,3 ± 0,19 <sup>b</sup>	2,5 ± 0,60 <sup>b</sup>	3,1 ± 0,18 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,50 <sup>c</sup>	3,4 ± 0,22 <sup>c</sup>	4,3 ± 0,26 <sup>b</sup>
<b>T3</b>	2,5 ± 0,14 <sup>b</sup>	2,7 ± 0,52 <sup>b</sup>	3,4 ± 0,45 <sup>b</sup>	4,0 ± 0,39 <sup>b</sup>	5,0 ± 0,20 <sup>b</sup>	6,8 ± 0,22 <sup>a</sup>
<b>T4</b>	2,05 ± 0,22 <sup>c</sup>	2,09 ± 0,39 <sup>b</sup>	2,6 ± 0,27 <sup>c</sup>	3,2 ± 0,48 <sup>c</sup>	3,3 ± 0,29 <sup>c</sup>	3,0 ± 0,67 <sup>c</sup>

Médias acompanhadas por letras diferentes na mesma coluna e no mesmo dia apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. C: controle (sem adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico); T1: 2,5% de solução de lactato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina; T2: 2,5% de solução de lactato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina seguida de 2,5% de solução de ácido láctico; T3: 2,5% de solução de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina; T4: 2,5% de solução de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina seguida de 2,5% de solução de ácido láctico

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; LOPEZ-MENDOZA; RUIZ; MATA, 2007).

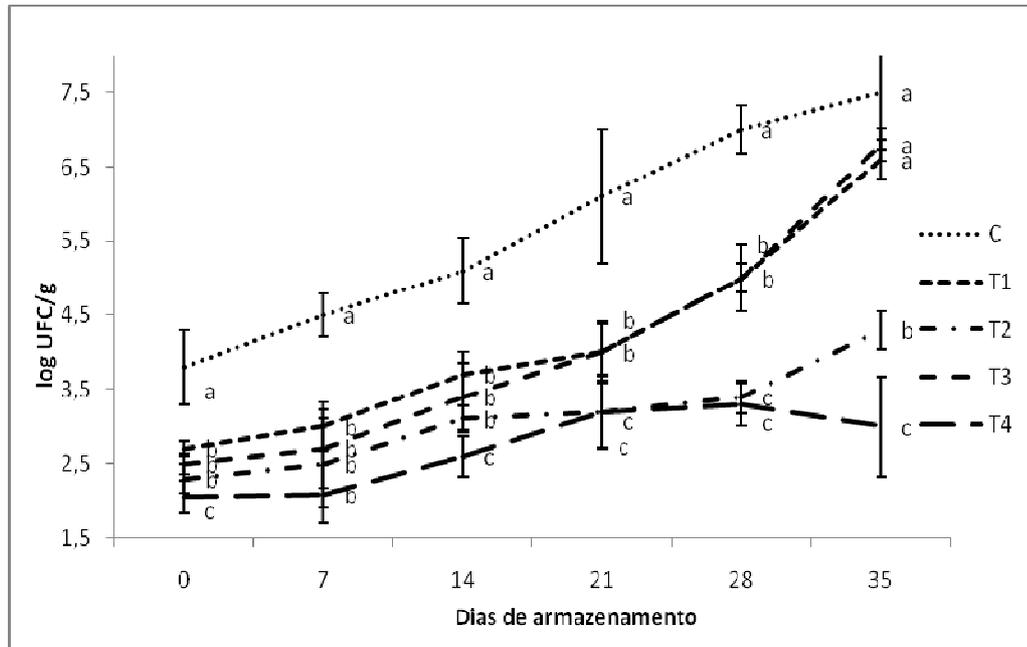


Figura 3 – Valores médios e desvio padrão do número de colônias de bactérias lácticas em salsichas submetidas à adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico, embaladas à vácuo durante o período de armazenamento de 35 dias a temperatura de 5°C.

Sendo:

C: controle (sem adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico); T1: 2,5% de solução de lactato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina; T2: 2,5% de solução de lactato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina seguida de 2,5% de solução de ácido láctico; T3: 2,5% de solução de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina; T4: 2,5% de solução de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina seguida de 2,5% de solução de ácido láctico

Os tratamentos T1 e T3 apresentaram respectivamente 0,9 e 0,7 log<sub>10</sub> UFC/g de redução no crescimento do número de colônias de bactérias lácticas, em relação ao controle após 35 dias de armazenamento, não apresentando um efeito significativo ( $p < 0,05$ ), sugerindo desta forma, que esses tratamentos apresentaram somente um efeito bacteriostático, (em relação ao dia 0) mas não bactericida, pois ao final do período de armazenamento as contagens foram próximas ao controle, semelhante ao comportamento dos microrganismos aeróbios mesófilos.

Porém, diferentemente dos microrganismos aeróbios mesófilos, o tratamento T3, obteve as maiores contagens para bactéria lácticas, sendo, portanto a aplicação no pós-tratamento térmico de nisina, mais eficaz, utilizando na formulação lactato de sódio. DIEZ et al.,(2008), utilizando lactato de potássio a 3% na formulação da lingüiça cozida (chouriço), apresentou uma maior redução no crescimento das bactérias lácticas, comparado com a mistura de lactato de potássio e diacetato de sódio.

Resultados deste trabalho, estão de acordo com Castro (2002), que 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 lácticas a temperaturas de 8º ou 12ºC. Confirmando que o efeito da nisina precisa ser reforçado pela combinação com outros tratamentos, como os antimicrobianos, utilizados no tratamento T4, também para as bactérias lácticas.

Como a legislação, RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA, não apresenta padrões microbiológicos de bactérias lácticas para a salsicha, foi considerado como limite o valor de  $\leq 4 \log_{10}$  UFC/g, adotado pela empresa, para verificar o final da vida de prateleira. Assim, a amostra controle, no sétimo dia, já não estava dentro dos padrões microbiológicos estipulados para tal produto, sendo considerada inadequada para o consumo, do ponto de vista microbiológico. Como exposto por Jay (2005) e Battistella (2008) e confirmado através deste estudo, em salsichas refrigeradas e embaladas em condições anaeróbias, as bactérias lácticas fazem parte da microbiota predominante.

Os tratamento T1e T3 apresentaram uma vida de prateleira de 21 dias, acrescentando ao produto 14 dias a mais na vida de prateleira em relação ao controle. O tratamento T2 apresentou uma vida de prateleira de 28 dias, acrescentando ao produto 21 dias a mais na vida de prateleira em relação ao controle. Porém o tratamento T4, no final da vida de prateleira estipuladora pela indústria, não atingiu o valor de  $\leq 4 \log$  UFC/g, sendo assegurada a sua qualidade, em termos microbiológicos, acrescentando 28 dias a mais na vida de prateleira da salsicha em relação ao controle. Esses resultados mostraram que as salsichas submetidas ao tratamento T4, apresentaram uma maior vida útil comparada aos outros tratamentos utilizados neste estudo (T1, T2 e T3), quando considerado para

as bactérias lácticas, sugerindo-se, portanto, um aumento para a vida útil da salsicha além da proposta pela empresa.

#### 4.1.3 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A tabela 7 apresenta a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em salsichas submetidas à adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico embaladas a vácuo durante o período de armazenamento de 35 dias a temperatura de 5°C.

Tabela 7 – Ocorrência de *Listeria Monocytogenes* em salsichas submetidas à adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico, embaladas a vácuo durante o período de armazenamento de 35 dias a temperatura de 5°C.

Tratamentos	Dias de armazenamento					
	0	7	14	21	28	35
<b>Controle</b>	Presença	Presença	Presença	Presença	Presença	Presença
<b>T1</b>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Presença	Presença
<b>T2</b>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<b>T3</b>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<b>T4</b>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

C: controle (sem adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico); T1: 2,5% de solução de lactato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina; T2: 2,5% de solução de lactato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina seguida de 2,5% de solução de ácido láctico; T3: 2,5% de solução de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina; T4: 2,5% de solução de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina seguida de 2,5% de solução de ácido láctico

Observa-se que na amostra controle foi detectada a presença de *Listeria monocytogenes* do início (dia zero) ao final do período de armazenamento de 35 dias. Correlacionando estes resultados com os valores de pH apresentados na

tabela 8, verificamos que houve crescimento de *Listeria monocytogenes* em uma grande faixa de pH de 6,3 a 4,8. De acordo com Jay, (2005) o pH de 6 a 8, é considerada a faixa ótima de crescimento, embora algumas pesquisas tenham demonstrado o seu crescimento em pH de 4,1 a 9,6, como pode ser isto no atual estudo. Também de acordo com a Instrução Normativa nº 9 do MAPA, os produtos prontos para o consumo, que apresentam risco a saúde, quanto à presença de *Listeria monocytogenes* estão compreendidos na faixa de pH > 4,4.

Petinatti; Telles; Ballian, (2006) verificaram a presença de *Listeria monocytogenes* em 218 (55,4%) das 394 amostras de salsichas tipo *hot dog* comercializadas na cidade de São Paulo. Lapenda (2010) verificou na cidade do Recife que, entre os embutidos analisados, as salsichas apresentaram os maiores índices de contaminação para *Listeria* spp. com 18,75% e 16,67% e para *Listeria monocytogenes*.

A alta ocorrência de *Listeria monocytogenes* nas salsichas controle, mesmo não havendo correlação com dados epidemiológicos de listeriose no Brasil, é bastante preocupante para a saúde pública, em especial, para as pessoas do grupo de risco como idosos, crianças e imunocomprometidos, visto que, pode acarretar graves problemas, como infecção do sistema nervoso central, septicemia, meningite, infecção cervical ou intra-uterina em gestantes, podendo provocar aborto (LAPENDA, 2010; JAY, 2005). Dentre as doenças transmitidas por alimentos, a listeriose é considerada a de maior taxa de fatalidade (LAPENDA, 2010).

Embora a avaliação da matéria-prima e do tratamento térmico da salsicha não tenha feito parte deste estudo, e, em razão da indústria onde foi realizado o trabalho possuir implantado e monitorado na linha de produção da salsicha a Análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), tendo como Ponto crítico de controle (PPC) a etapa de cozimento, sugere-se que a alta contaminação de *Listeria monocytogenes* tenha ocorrido na etapa de pós-tratamento térmico, pois segundo Barretto et al., (2001) o maior risco de contaminação com *Listeria monocytogenes* provém da contaminação pós-processamento térmico, devido a condições higiênicas deficiente em alguma etapa do processo industrial. Também de acordo com Samelis e Metaxopoulos (1999) salsichas contaminadas com *Listeria monocytogenes* que foram submetidas à temperatura de cozimento de 74°C/ 4-5 horas foi garantida a sua destruição. Cezar (2008) comprovou que a *Listeria monocytogenes* (na indústria nº 2) isolada na matéria-prima carne não foi detectada no produto acabado, após

sofrer tratamento térmico nas mesmas condições deste estudo, ou seja, temperatura interna de cozimento da salsicha  $\geq 74^{\circ}\text{C}$ .

Nos tratamentos T2, T3 e T4 não foi detectada a presença de *Listeria monocytogenes* em salsichas durante o período de armazenamento de 35 dias. Geornaras, et al.,(2006) observaram que todos os tratamentos de imersão no pós-processamento térmico de lingüiça chouriço (que continham dentre outros, os mesmos utilizados neste estudo), resultaram em redução inicial de *Listeria monocytogenes* intencionalmente contaminadas, em relação ao controle, independente da utilização ou não da mistura de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação. A inclusão de antimicrobianos na formulação foi estudada por Samelis et al., (2002) e Barpalia et al., (2004) que confirmaram a inibição de *Listeria monocytogenes* utilizando a combinação de lactato de sódio e diacetato de sódio em produtos cárneos.

Diante destes resultados, mesmo havendo a possibilidade de ter ocorrido falhas no processo de higienização do pós-tratamento térmico, a utilização de antimicrobianos na formulação e pós-tratamento térmico (T2, T3 e T 4) garantiram o efeito listerial em salsichas armazenadas a temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$ .

Já, no tratamento T1 foi detectada a presença de *Listeria monocytogenes* durante o período de armazenamento, ou seja, a partir do 28º dia, até o final do período de armazenamento de 35 dias. Esses dados indicam que a sinergia entre lactato de sódio na formulação e nisina no pós-tratamento térmico não foi eficiente para garantir o efeito listerial até o final do período de armazenamento da salsicha a temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$ . A incapacidade da nisina em manter a sua atividade listerial durante o armazenamento está de acordo com outros estudos em produtos prontos para o consumo (LUCHANSKY; CALL, 2004; SAMELIS et al., 2005), evidenciando que, a ação da nisina precisa ser reforçada com a ação de outros tratamentos, no caso deste estudo do ácido láctico, como pode ser observado no tratamento T2.

Diferentemente, Castro (2002) observou que o tratamento superficial de salsichas com nisina (200ppm em solução de ácido fosfórico 0,01%) reduziu significativamente a população de *Listeria monocytogenes* em salsichas artificialmente contaminadas. Corroborado por GEORNARAS et al., (2005) que mostrou que a ação seqüencial de nisina seguida de ácido láctico resultou em inibição total de *Listeria monocytogenes* em fatias de presunto e mortadela durante o período de armazenamento de 48 dias.

Apesar de, a RDC Nº 12 da ANVISA, não definir padrões específicos para a *Listeria monocytogenes* em salsichas, a Instrução Normativa nº 09, do MAPA, define ausência de *Listeria monocytogenes* em 25 g para salsichas. Desta forma, o tratamento T1, no 28º e 35º dias de armazenamento apresentaram resultados (salsicha) que foram considerados impróprios para o consumo, pois são passíveis de causarem graves surtos de infecções alimentares.

## **4.2 Análise Físico-química**

### **4.2.1 Determinação do pH**

Os valores de pH das salsichas submetidas aos diferentes tratamentos estão apresentados na tabela 8. A amostra controle, apresentou valor de pH de 6,3 no dia zero (0) e após 35 dias de armazenamento apresentou uma redução significativa, atingindo um pH de 4,8. Correlacionando este resultado com o crescimento microbiano, a redução do pH das amostras controle pode ser justificado pelo maior crescimento da população de bactérias lácticas (figura 3), que de acordo com DIEZ et al.,(2008) as bactérias lácticas principalmente heterofermentativas, tornam-se a microflora predominante em salsichas, durante o armazenamento produzindo o ácido láctico que conseqüentemente reduz o pH.

Tabela 8 – Valores médios e desvio padrão de pH das salsichas submetidas à adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico, embaladas a vácuo durante o período de armazenamento de 35 dias a temperatura de 5°C.

	Dias de armazenamento					
	0	7	14	21	28	35
<b>C</b>	6,3 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,02 <sup>a</sup>	5,6 ± 0,01 <sup>b</sup>	5,3 ± 0,02 <sup>b</sup>	5,0 ± 0,01 <sup>c</sup>	4,8 ± 0,02 <sup>c</sup>
<b>T1</b>	5,9 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,0 ± 0,02 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,5 ± 0,02 <sup>a</sup>
<b>T2</b>	5,7 ± 0,02 <sup>c</sup>	5,6 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,03 <sup>b</sup>	5,4 ± 0,01 <sup>b</sup>	5,3 ± 0,01 <sup>b</sup>	5,3 ± 0,02 <sup>b</sup>
<b>T3</b>	5,9 ± 0,03 <sup>b</sup>	6,0 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,02 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,02 <sup>a</sup>
<b>T4</b>	5,5 ± 0,01 <sup>c</sup>	5,4 ± 0,01 <sup>b</sup>	5,2 ± 0,01 <sup>c</sup>	5,1 ± 0,01 <sup>c</sup>	5,3 ± 0,01 <sup>b</sup>	5,4 ± 0,02 <sup>b</sup>

Médias acompanhadas por letras diferentes na mesma coluna e no mesmo dia apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. C: controle (sem adição de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico); T1: 2,5% de solução de lactato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina; T2: 2,5% de solução de lactato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina seguida de 2,5% de solução de ácido láctico; T3: 2,5% de solução de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina; T4: 2,5% de solução de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação e imersão em 200 mg/l de solução de nisina seguida de 2,5% de solução de ácido láctico

Em todos os tratamentos os valores de pH apresentaram uma redução inicial (dia zero) comparada com o controle sendo que os tratamentos T2 e T4, os que apresentaram as maiores reduções, 0,6 e 0,8 unidades de pH respectivamente. Geornaras et. al., (2006) em lingüiça formulada (chouriço) após o processo de imersão em solução de nisina seguida de ácido láctico apresentou reduções iniciais semelhantes a este estudo, na ordem de 0,89 unidades de pH, independente da adição ou não de antimicrobianos na formulação. Já Geornaras et. al., (2005) aplicando os mesmos tratamentos em mortadela e presunto fatiado apresentou reduções superiores a este trabalho de 1,31 a 2,12 unidades de pH, provavelmente devido a facilidade destes produtos absorverem estas soluções.

Já os tratamentos T1 e T3 resultaram em pequenas reduções iniciais de 0,4 unidades de pH, e também após 35 dias de armazenamento atingiram os maiores valores de pH de 6,5 e 6,4 unidades respectivamente, independente do tipo de antimicrobiano utilizado na formulação, não havendo uma explicação para o

ocorrido, pois estes tratamentos (T1 e T3) apresentaram os maiores crescimentos de bactérias lácticas. Semelhante ao presente estudo, Geornaras et. al., (2006) também encontraram pequenas reduções quando lingüiça formulada (chouriço), mortadela, presunto e salsichas foram imersas em solução de nisina.

Independente das reduções de pH observadas, nos diversos tratamentos as maiores reduções ao final de 35 dias de armazenamento foram observadas nos tratamentos T2 e T4, com respectivamente 5,3 e 5,4 unidades de pH. Segundo Terra et. al. (2004), a verificação do pH dos produtos cárneos é utilizada como um dos critérios de sua qualidade, sendo que valores de pH inferiores a 6,2, tornam os produtos cárneos mais protegidos contra a ação de microrganismos indesejáveis. Desta forma, os valores de pH dos tratamentos (T2 e T4) apresentam-se dentro do limite recomendado, sendo relacionado com o menor crescimento microbiano observado nas tabelas 5 e 6.

## 5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nas condições do presente estudo, pode-se chegar às seguintes conclusões:

- Houve um sinergismo entre antimicrobianos adicionados na formulação e no pós-tratamento térmico, para o controle de bactérias aeróbia mesófilas, láticas e *Listeria monocytogenes*.

- A adição da mistura de lactato de potássio e diacetato de sódio na formulação da salsicha, seguida de imersão no pós-tratamento térmico de nisina seguida de ácido láctico (T4), mostrou ser o mais eficaz no controle dos microrganismos aeróbios mesófilos e das bactérias láticas, contribuindo para o aumento da vida de prateleira da salsicha em 28 dias, em relação ao controle.

- O controle das bactérias aeróbias mesófilas e láticas, só foi efetivo quando utilizado no pós-tratamento térmico nisina seguida de ácido láctico, independente do antimicrobiano utilizado na formulação.

- Não houve sinergismo entre os antimicrobianos adicionados na formulação e a nisina (utilizada no pós-tratamento térmico), não sendo eficaz no controle dos microrganismos aeróbios mesófilos e das bactérias láticas.

- Não houve crescimento de *Listeria monocytogenes* utilizando os antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico testados nos tratamentos (T2, T3 e T4), sendo efetivos para o controle de *Listeria monocytogenes*.

- A utilização de lactato de sódio na formulação só foi eficaz para o controle de *Listeria monocytogenes*, quando utilizado no pós-tratamento térmico a nisina seguida de ácido láctico.

- Mesmo havendo crescimento de *Listeria monocytogenes* nas amostras controle a utilização de antimicrobianos na formulação e no pós-tratamento térmico garantiu a sua eliminação nos demais tratamentos, com exceção do T1.

## 6 SUGESTÕES

Sugestões para trabalhos futuros:

- Avaliar o comportamento dos microrganismos, verificados neste estudo, em todas as etapas de produção da salsicha, desde a matéria-prima até o produto final, identificando possíveis fontes de contaminação;

- Realizar o acompanhamento microbiológico através da análise de *swab* de equipamentos e instalações, e também a análise microbiológica do ambiente, identificando possíveis falhas na higienização que levam a contaminação pelos microrganismos estudados;

- Revalidar o programa de APPCC, identificando os pontos críticos de controle (PCC) para o controle de *Listeria monocytogenes* e bactérias lácticas;

- Avaliar o produto (salsicha), submetida aos diferentes tratamentos avaliados neste experimento, também, quanto à análise sensorial, avaliando se a adição dos sais de ácidos orgânicos tem interferência sensorial;

- Avaliar o produto (salsicha) quanto ao residual do teor de sódio e potássio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal Food Microbiology**, v.28, n.2, p.169-85, 1995.

AMMOR, M. S.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional *starter* cultures in dry sausage production: an update. **Meat Science**, v.76, p. 138-146, 2007.

ARAÚJO, P. C. C. et al. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em Produtos de Carne de Peru Comercializados na Cidade de Niterói- RJ - Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre: UFRGS, p. 19-24, 2002.

AYMERICH, M. T.; HUGAS, M.; MONFORT, J. M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. **Food Science and Technology International**, v.4, p.141-158, 1998.

BARBUTI, S.; PAROLARI, G. Validation of manufacturing process to control pathogenic bacteria in typical dry fermented products. **Meat Science**, v.62, p.323-329, 2002.

BARMPALIA, I.M., et al. Control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters with antimicrobials in the formulation and by dipping in organic acid solutions. **Journal Food Protection**, n.67, p. 2456–2464, 2004.

BARMPALIA, I.M. et al. Effect of antimicrobials as ingredients of pork bologna for *Listeria monocytogenes* control during storage at 4 or 10 C°. **Food Microbiology**, v.22, p. 205–211, 2005.

BARRETTO, E. S. S. **Listeriose**. 2001, Disponível em <<http://www.smsonline.rio.rj.gov.br/artigos>>. Acessado em: 20 de maio 2011.

BATTISTELLA, P. M. D. **Análise de sobrevivência aplicada á estimativa da vida de prateleira de salsicha**. 2008, 115p. Dissertação (Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto 2244/1997. Altera dispositivos do Decreto 30.691/1952, que aprovou o **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Diário Oficial da União. Brasília, 05/06/1997.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Portaria nº 29, de 22 de Janeiro de 1996. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 22 de janeiro de 1996. Disponível em: [HTTP://www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br).

BRASIL, MAPA. **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003**. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 14, 18 set. 2003. Seção 1.

BRASIL, MAPA. **Instrução Normativa nº 09, de 08 de abril de 2009**. Institui os Procedimentos de Controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 6, 05 abr. 2000. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico de Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de janeiro de 2001.

BENKERROUM, N. et al. Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis subsp. Lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 56-63, 2005.

BERSOT, L.S. et al. Production of mortadella: behavior of *L. monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Science**. v. 57, p.19-26, 2001.

BINGOL, E. B.; BOSTAN, K. Effect of sodium lactate on the microbiological quality and shelf life of sausages. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, v.31, n.5, p.333-339, 2007.

CASTRO, A.P. Sobrevivência de bactérias aeróbias mesófilas, psicrotróficas, bactérias lácticas e *Listeria monocytogenes* em salsichas submetidas a tratamento com nisina. 2002, 100 p. Dissertação (Mestrado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, 2002.

CALIL, E. M. B. et al. Importância da Inspeção Veterinária em Produtos Embutidos de Origem Animal. **Comunicações Científicas Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 14, n. 2, p. 91-97, 1990.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.131-149, 1999.

CASTELLANO, P. H., HOLZAPFEL, W. H., VIGNOLO, G. M. The control of *Listeria innocua* and *Lactobacillus sakei* in broth and meat slurry with the bacteriocinogenic strain *Lactobacillus casei* CRL 705. **Food Microbiology**, n.21, p.291–298, 2004.

CESAR, A. P. R. **Listeria spp. e Listeria monocytogenes na produção de salsicha tipo hot dog e hábitos de consumo.**2008, 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

COLAK, H. et al. Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermented sausage (sucuk). **Food Control**, v.18, p. 30-32, 2007.

COMI, G. et al. *Listeria monocytogenes* serotypes in Italian meat products. **Applied Microbiology**, v.15, p. 168-171,1992.

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

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

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.777-788, 2005.

DAVIES, E. A. et al. Efetive use of nisina to control lactic acid bacterial spoilage in vaccum-packed bologna type sausage. **Journal of food protection**, v.62 n.9 p.1004-1010, 1999.

DEEGAN, L.H. et al. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension – A review. **International Dairy Journal**, v.16, p. 1058-1071, 2006.

DE BARROS, J. R. Aplicação de nisina em tripa natural para o controle de microrganismos deteriorantes em salsicha. 2009, 63p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Centro Universitário de Instituto Mauá de Tecnologia, SP, 2009.

DE MARTINIS, E. C. P. et al. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 32-37, Jan., 2001.

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**, n.18, p.191-208, 2002.

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

DESTRO, M. T.; KABUKI, D. Y.; SERRANO, A. M. Isolation of *Listeria species* from some brasilian meat and dairy products. **Food Control**, v.2, p.110-112,1991.

DIEZ, A. M. et al. Application of organic acid salts and high-pressure treatments to improve the preservation of blood sausage. **Food Microbiology**, v.25 p.154–161, 2008.

DRIDER, D.; et al. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

FAVERO, J. A. **SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**. A produção animal na visão dos brasileiros. Piracicaba: FEALQ, p. 158-163, 2001.

FERREIRA, M. S. Lactato de Sódio e Potássio aumentam vida de prateleira e melhoram a segurança. **Revista Nacional da Carne**, v.270, p. 58-59, 1999.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 350p.

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

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiología de los alimentos**. 4ed., Espanha:Editorial Acribia S. A., 681 p, 1993.

GEORNARAS, I. et al. Post processing antimicrobial treatments to control *Listeria monocytogenes* in commercial vacuum-packaged bologna and ham stored at 10 C°. **Journal Food Protection**, v. 68, p.991–998, 2005.

GEORNARAS, I. et al. Post-processing application of chemical solutions for control of *Listeria monocytogenes*, cultured under different conditions, on commercial moked sausage formulated with and without potassium lactate-sodium diacetate. **Journal Food Microbiology**, v 23, p.762–771, 2006.

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

HANLIN, M. B. et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have a greater antibacterial activity. **Journal of food protection**, v.56, n.3, p.252-255, 1993.

HERNANDEZ, D.; CARDELL, E.; ZARATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.77-84, 2005.

HOLZAPFEL, W. H.; GEINSEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 343-362, 1995.

ISLAM, M., et al. Control of *Listeria monocytogenes* on turkey frankfurters by generally recognized-as-safe preservatives. **Journal Food Protection**, v.65, p.1411–1416, 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 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.
- KALINOWSKI, R. M.; TOMPKIN R. B. Psychrotropic clostridia causing spoilage in cooked meat and poultry products. **Journal Food Protection**, v. 62, p. 766–772,1999.
- LAPENDA, A. M. V. Ocorrência de *Listeria* spp em embutidos resfriados comercializados na cidade do Recife, PE. 2010. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciência Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.
- LEE, C.H. et al. Influence of antimicrobial packaging on Kinetics of spoilage microbial growth in milk and orange juice. **Journal of food Engineering**, v. 65, p.527-531, 2004.
- LEISTNER, L., GOULD, G. Hurdle Technologies: Combination Treatments for Food Stability, Safety and Quality. **Kluwer Academic/ Plenum Publishers**, New York, NY, 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.
- LOVETT, J.; TWEDT, R. M. Bacteria associated with foodborne diseases *Listeria*. **Food Technology**, v.42, n. 2, p.188-191, 1988.
- LU, Z. et al. Inhibitory effects of organic acid salts for control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters. **Journal Food Protection**, v. 68, p. 499–506, 2005.
- LUCHANSKY, J.B., Call, J.E. Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. **Journal Food Protection**, v. 67, p. 1017–1021, 2004.
- LÜCKE, F. K. Fermented meat products. **Food Research International**, v.27, p.299–307, 2000.

MAN, D.; ADRIAN, J. Shelf Life Evolution of Foods. Gaithersburg, Aspen, 2000.

MARTINEZ, Y. B.; et al. 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.

MARTINS, E. A. **Listeria monocytogenes em produtos fatiados do tipo ready-to-eat, presunto cozido e salame, comercializados no município de São Paulo: ocorrência, quantificação e sorotipagem.** 2009, 76p. Tese (Doutorado da Faculdade de Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, SP, 2009.

MARTINS, L. L. **Avaliação do perfil bacteriológico de salsichas tipo hot dog tradicional e de frango comercializadas nos municípios do Rio de Janeiro e Niterói - RJ com determinação de atividade de água e PH.** 2006, 197p. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de produtos de origem Animal) – Universidade Federal Fluminense, RJ, 2006.

MBANDI, E.; SHELEF, L.A. Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* in beef bologna. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.191–198, 2002.

McAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **Microbiology Review**, v. 25, p. 285-308, 2001.

McMEEKIN, T. A. et al. Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosus*. **Journal of Applied Environmental**, v.62, p. 543-550, 1987.

MEAD, P. S. et al. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. **Epidemiology Infection**, v.134, p.744-751,2006.

MOTTIN, V. D. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella sp* em embutidos de carne suína cozidos e fatiados comercializados em supermercados no município de Porto Alegre, RS. **Higiene Alimentar**, v. 21, n. 150, p. 191, abr, 2006.

MURIANA, P.M. Bacteriocins for control of *Listeria spp.* in food. **Journal of Food Protection** (Suppl.), v.37, p. 54–63, 1996.

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

NATTRESS, F. M. et al. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.111-119, 2001.

NICOLAI, B. M. et al. Predictive modelling of surface growth of lactic acid bacteria in vacuum-packed meat. **Food Microbiology**, v.10, p. 229-238, 1993.

ODA, S. H. I. et al. Detecção de cor em filés de peito de frango. **Revista Nacional da Carne**, v.28, p.30-34, 2003.

PARDI, M. C. et al. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. 2.ed. Goiânia: Ed. da UFG, 2007. 2 v. 1152 p.

PARMIGIANI, P. Avanços e desafios para os processados suínos. **Revista Nacional da Carne** n. 410, ano XXXV p. 34-41, Abril, 2011.

PEREIRA, D. B. **Estabilidade da nisina durante o armazenamento e seu papel na vida de prateleira de salsichas**. 2004, 42p. Dissertação (Mestrado Departamento de Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2004.

PETTINATI, N. N.; TELLE, E.O.; BALLIAN, S.C. *Listeria monocytogenes* in *Hot Dog* sausages obtained from groceries stores in the city of São Paulo – a comparative and retrospective analysis of human Listeriosis Isolates. **Veterinária e Zootecnia**. v.13, n.2, p.182-191, 2006.

RODRIGUES, R. A. **Conservantes naturais no processamento de Lingüiça frescal**. 1998, 91 p. Dissertação( Mestrado em Ciência e Tecnologia e Ciência dos alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1998.

SAMELIS, J. et al. Organic acids and their salts as dipping solutions to control *Listeria monocytogenes* inoculated following processing of sliced pork bologna stored at 4 C° in vacuum packages. **Journal Food Protection**, v.64, p.1722–1729, 2001.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. **Food Microbiology**, v. 17, p. 329 - 340. 2000.

SAMELIS, J., et al. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4 C° in vacuum packages. *Lebensm. Wiss. Technology*, v. 38, p. 21–28, 2005.

SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J. Incidence and principal sources of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. **Food Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 465-477, 1999.

SARMENTO, C. M. P. **Modelagem do crescimento microbiano e avaliação sensorial no estudo da vida de prateleira da mortadela e da lingüiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico**. 2006, 100 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

SCANNELL, A.G. et al. 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.

SILVA, W.P. et al. *Listeria spp.* no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.3, mai-jun, 2004.

SILVA, M. C. D. et al. Avaliação de Métodos Para a Detecção de *Listeria* em Queijos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas/SP, v. 18, n. 2, p. 28-54, mai/jul 1998.

STEKELEMBURG, F. K. Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* in Frankfurter sausage by the addition of potassium lactate and sodium diacetate mixtures. **Food Microbiology**, v. 20, p. 133–137, 2003.

TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo: Editora Unisinos. 1998, 216 p.

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

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

TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal food Protection**, v.65 n.4, p.709-725, 2002.

VERMEIREN, L. et al. Evaluation of meat born lactis acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. **International Journal of food Microbiology**, 96, 149-164, 2004.

WIJTZES, T. et al. Development and validation of a combined temperature, water activity, pH model for bacterial growth rate of *Lactobacillus curvatus*. **International Journal Food Microbiology**, v. 63, p. 57-64, 2001.