UNIVERSIDADE DE SAO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS
Área de Bromatologia

**Sobrevivência de bactérias aeróbias mesófilas,
psicrotróficas, bactérias láticas e *Listeria monocytogenes*
em salsichas submetidas a tratamento com nisina**

ALEXANDRA PASTOR CASTRO

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Bernadette D.G.M. Franco

SÃO PAULO

2002

ALEXANDRA PASTOR CASTRO

**Sobrevivência de bactérias aeróbias mesófilas,
psicrotróficas, bactérias láticas e *Listeria monocytogenes*
em salsichas submetidas a tratamento com nisina**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Orientadora/Presidente

Prof^a. Dr^a. Elaine Cristina P. de Martinis

Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Destro

São Paulo, abril de 2002.

**A Deus,
pela oportunidade da vida e
pela perfeição dos sentidos**

**Aos meus pais, Encarnación e Jesus,
pela dedicação incondicional e absoluta**

**Ao meu amor Alexandre
por me mostrar a cada dia o quão bonita a vida é**

Agradecimentos

À Prof^ª. Dr^ª Bernadette D.G.M. Franco, pela acolhida hospitaleira, e pelo apoio e confiança depositados em mim durante o curso.

Ao Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto, sempre presente em todos os momentos importantes da minha vida, como fonte de estímulo ao aprendizado e como exemplo de ser humano e profissional.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Teresa Destro, pela atenção e amizade, por estar sempre pronta para compartilhar experiências e enriquecê-las.

À Prof^ª. Dr^ª. Mariza Landgraf, pelo convívio saudável.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudos que permitiu o desenvolvimento tranqüilo e ininterrupto do trabalho.

À Prof^ª. Dr^ª. Elaine Cristina P. de Martinis, pelas sugestões oportunas que resultaram na melhoria da dissertação.

Às funcionárias Kátia e Lúcia, pelas palavras de estímulo e pela colaboração nos momentos difíceis, amigas sempre prontas para ajudar.

Ao Sr. Eduardo Treno, por fornecer as embalagens para o experimento.

À Sr^ª. Nancy do grupo B.V. Representações, que contribui para realização da pesquisa através do fornecimento da amostra de Nisaplin.

Aos Senhores Mário Roberto do Nascimento, Júlio César do Nascimento, e Athaide Francisco de Almeida, por me acolherem em um momento difícil colaborando, de maneira sempre prestativa, para a realização da parte experimental dessa pesquisa.

À Prof^ª. Dr^ª. Susana Saad e ao Prof. Dr. Sunao Sato, por permitirem a utilização da seladora à vácuo.

À amiga Jane Mary Gelinski, pelo apoio e companheirismo durante nossa convivência diária.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Alcina, Angela, Cláudia, Cristina, Cristiano, Dory, Elisa, Fábio, Gunnar, Juliana, Lina, Luciano, Maria, Mariana, Paula, Ricardo, Vanessa e Viviane, pelo convívio agradável no ambiente de trabalho e também pelos bons momentos de descontração que compartilhamos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Coleta e transporte das amostras	24
3.2 Preparo das soluções de ácido fosfórico e de nisina	24
3.3 Preparo das suspensões contendo <i>Listeria monocytogenes</i>.....	25
3.4. Tratamento das salsichas com solução de nisina	28
3.5. Contaminação artificial das salsichas	28
3.6 Avaliação da eficiência da ação da nisina sobre <i>Listeria monocytogenes</i> em salsichas artificialmente contaminadas	29
3.7 Avaliação da eficiência da ação da nisina sobre microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos e bactérias lácticas.	30
3.7.1. Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas	30
3.7.2. Enumeração de bactérias aeróbias psicrotróficas.....	31
3.7.3. Enumeração de bactérias lácticas	31
3.8. Análise estatística.....	31
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Valores de pH das soluções de ácido fosfórico e de nisina.....	34
4.2. Populações médias de <i>Listeria monocytogenes</i> presentes nas suspensões bacterianas utilizadas para a contaminação artificial das salsichas.....	34
4.3. Avaliação da eficiência da ação da nisina sobre microrganismos deteriorantes naturalmente presentes em salsichas armazenadas a 8°C.	35

4.4. Avaliação da eficiência da ação da nisina sobre microrganismos deteriorantes naturalmente presentes em salsichas armazenadas a 12°C.	37
4.5. Avaliação da eficiência da ação da nisina sobre <i>Listeria monocytogenes</i> em salsichas artificialmente contaminadas e armazenadas a 8°C.	39
4.6. Avaliação da eficiência da ação da nisina sobre <i>Listeria monocytogenes</i> em salsichas artificialmente contaminadas e armazenadas a 12°C.	40
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
8. ANEXOS	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da nisina A (GROSS e MORELL, 1971).....	14
Figura 2. Esquema de atuação de agentes quelantes sobre cátions divalentes da camada LPS da membrana externa de bactérias Gram negativas (HELANDER et al., 1997).	17
Figura 3. Modelos de formação de poros em membrana citoplasmática de células sensíveis à bacteriocina : (A) "wedge-like" e (B) "barrel-stave" (ROSA, 2001).	19
Figura 4. Procedimentos adotados para o preparo dos inóculos alto e baixo utilizados para contaminação artificial das salsichas.	27
Figura 5. Esquema de tratamento, contaminação e distribuição dos subgrupos para cada lote de salsichas analisado.....	33
Figura 6. Populações médias de microrganismos mesófilos naturalmente presentes em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas à vácuo e armazenadas a 8°C	51
Figura 7. Populações médias de bactérias láticas naturalmente presentes em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas à vácuo e armazenadas a 8°C	51
Figura 8. Populações médias de microrganismos psicrotróficos naturalmente presentes em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas à vácuo e armazenadas a 8°C	52
Figura 9. Populações médias de microrganismos mesófilos naturalmente presentes em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas à vácuo e armazenadas a 12°C	52
Figura 10. Populações médias de bactérias láticas naturalmente presentes em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas à vácuo e armazenadas a 12°C	53
Figura 11. Populações médias de microrganismos psicrotróficos naturalmente presentes em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas à vácuo e armazenadas a 12°C	53

- Figura 12.** Populações médias de *L. monocytogenes* artificialmente inoculadas (10^3 a 10^4 UFC/cm²) em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8 °C por 42 dias.64
- Figura 13.** Populações médias de *L. monocytogenes* artificialmente inoculadas (10^3 a 10^4 UFC/cm²) em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12 °C por 42 dias.64
- Figura 14.** Populações médias de *L. monocytogenes* artificialmente inoculadas (10^6 a 10^7 UFC/cm²) em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8 °C por 42 dias.65
- Figura 15.** Populações médias de *L. monocytogenes* artificialmente inoculadas (10^6 a 10^7 UFC/cm²) em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12 °C por 42 dias.65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de pH das soluções de 200 ppm de Nisaplin em ácido fosfórico grau alimentício a 0,1% e solução de ácido fosfórico grau alimentício a 0,1% utilizadas nas quatro repetições genuínas do experimento.....	34
Tabela 2. Populações médias de <i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/mL) presentes nas suspensões bacterianas, inóculo baixo e inóculo alto, utilizadas nas quatro repetições genuínas do experimento.	35
Tabela 3. Populações médias de microrganismos mesófilos em salsichas tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias.....	42
Tabela 4. Populações médias de microrganismos mesófilos em salsichas não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias. ...	42
Tabela 5. Populações médias de bactérias lácticas em salsichas tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias	43
Tabela 6. Populações médias de bactérias lácticas em salsichas não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias.	43
Tabela 7. Populações médias de microrganismos psicotróficos em salsichas tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias.....	44
Tabela 8. Populações médias de microrganismos psicotróficos em salsichas não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias. ...	44
Tabela 9. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de microrganismos mesófilos enumeradas nas diferentes repetições genuínas do experimento em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias.	45
Tabela 10. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de bactérias lácticas enumeradas nas diferentes repetições	

genuínas do experimento em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias..... 45

Tabela 11. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de microrganismos psicrotróficos enumeradas nas diferentes repetições genuínas do experimento em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias. 46

Tabela 12. Populações médias de microrganismos mesófilos em salsichas tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C durante 42 dias. 46

Tabela 13. Populações médias de microrganismos mesófilos em salsichas não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C durante 42 dias... 47

Tabela 14. Populações médias de bactérias lácticas em salsichas tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C durante 42 dias. 47

Tabela 15. Populações médias de bactérias lácticas em salsichas não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C durante 42 dias. 48

Tabela 16. Populações médias de microrganismos psicrotróficos em salsichas tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C durante 42 dias..... 48

Tabela 17. Populações médias de microrganismos psicrotróficos em salsichas não tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C durante 42 dias..... 49

Tabela 18. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de microrganismos mesófilos enumeradas nas diferentes repetições genuínas do experimento em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C. 49

Tabela 19. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de bactérias lácticas enumeradas nas diferentes repetições genuínas do experimento em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C durante 42 dias..... 50

Tabela 20. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de microrganismos psicrotróficos enumeradas nas diferentes repetições genuínas do experimento em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C..... 50

Tabela 21. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^3 a 10^4 UFC/cm²) , tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento... 54

Tabela 22. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^3 a 10^4 UFC/cm²) não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento. 55

Tabela 22. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^6 a 10^7 UFC/cm²), tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento..... 56

Tabela 24. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^6 a 10^7 UFC/cm²), não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento. 57

Tabela 25. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de *L. monocytogenes* (10^3 a 10^4 UFC/cm²) enumeradas em quatro repetições genuínas do experimento em salsichas embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C..... 58

Tabela 26. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de *L. monocytogenes* (10^6 a 10^7 UFC/cm²) enumeradas em quatro repetições genuínas do experimento em salsichas embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C..... 58

Tabela 27. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^3 a 10^4 UFC/cm²) tratadas com solução de Nisaplin®

em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento.....59

Tabela 28. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^3 a 10^4 UFC/cm²), não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento.60

Tabela 29. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^6 a 10^7 UFC/cm²), tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento.....61

Tabela 30. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^6 a 10^7 UFC/cm²), não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento.62

Tabela 31. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de *L. monocytogenes* (10^3 a 10^4 UFC/cm²) enumeradas em quatro repetições genuínas do experimento em salsichas embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C.....63

Tabela 32. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de *L. monocytogenes* (10^6 a 10^7 UFC/cm²) enumeradas em quatro repetições genuínas do experimento em salsichas embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C.....63

RESUMO

A nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e seu uso é permitido como conservador de alimentos em diversos países. Em 1998, o Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil, em atitude pioneira, autorizou a aplicação de 200 ppm de Nisaplin® em solução de ácido fosfórico grau alimentício na superfície de produtos cárneos embutidos, tais como salsichas, como alternativa tecnológica para aumentar a segurança microbiológica e a vida-de-prateleira desses produtos. Este trabalho avaliou a eficiência deste tratamento na inibição da deterioração microbiana e controle da multiplicação de *Listeria monocytogenes* em salsichas tratadas com nisina conforme preconizado, e armazenadas sob refrigeração (8°C) e abuso de temperatura (12°C). Salsichas foram coletadas em uma planta processadora da cidade de São Paulo e submetidas a tratamento por imersão em solução de 200 ppm de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício a 0,1% durante 1 minuto. Para o estudo da eficiência do tratamento sobre *Listeria monocytogenes*, as salsichas foram contaminadas experimentalmente após o tratamento através de imersão em suspensões contendo *L. monocytogenes* Scott A, resultando em dois níveis de contaminação superficial denominados baixo (10^3 - 10^4 UFC/cm²) e alto (10^6 - 10^7 UFC/cm²). Controles não tratados e não inoculados foram realizados concomitantemente. As amostras foram embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C e 12°C durante 42 dias. A enumeração das populações de microrganismos aeróbios mesófilos, bactérias láticas, microrganismos psicrotróficos e *L. monocytogenes* foi realizada semanalmente até o final do período de estocagem. Os resultados indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre as populações de bactérias aeróbias mesófilas, psicrotróficas e bactérias láticas em produtos tratados e não tratados com solução de Nisaplin® e armazenados a 8°C ou a 12°C. A redução das populações de *L. monocytogenes* em salsichas tratadas com Nisaplin® quando a contaminação superficial foi de 10^3 a 10^4 UFC/cm² e o produto foi armazenado a 8°C foi pequena (< 1 log UFC/cm²), porém estatisticamente significativa. Esses resultados indicam serem necessárias medidas adicionais para garantir a segurança do produto.

Palavras chave: nisina, salsichas, *Listeria monocytogenes*, deterioração microbiana

ABSTRACT

SURVIVAL OF MESOPHILIC AND PSYCHROTROPHIC AEROBES, LACTIC ACID BACTERIA AND *Listeria monocytogenes* IN NISIN-TREATED FRANKFURTERS.

Nisin is a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* and its use is permitted as a food preservative in several countries. In 1998, the Brazilian Ministry of Agriculture authorized the application of 200 ppm nisin (Nisaplin®) on the surface of meat products by immersion or spraying, as a technological alternative to increase safety and shelf-life of cooked frankfurters. This work intended to evaluate the effectiveness of this treatment on inhibition of microbial spoilage and control of growth of *Listeria monocytogenes* in frankfurters during storage under refrigeration (8°C) and temperature abuse (12°C). Frankfurters from a local meat industry were submerged for 1 min in nisin solution (200 ppm) in 0.1% phosphoric acid and experimentally contaminated with low (10^3 - 10^4 CFU/cm²) and high (10^6 - 10^7 CFU/cm²) levels of *L. monocytogenes*. Non-treated and non-inoculated controls were also prepared. Counts of lactic acid bacteria, aerobes (mesophilic and psychrotrophic) and *L. monocytogenes* were carried out weekly up to 42 days, in four genuine repetitions. Results available indicate that the differences of counts of mesophilic and psychrotrophic aerobes, lactic acid bacteria in nisin-treated and non-treated controls are not significant. Reduction of *L. monocytogenes* populations in nisin-treated frankfurters experimentally contaminated with low (10^3 - 10^4 CFU/cm²) levels of *L. monocytogenes* stored under refrigeration (8°C) was low (< 1 log UFC/cm²), but statistically significant. Results indicate that additional measures are necessary to ensure the safety of these products.

Key words: nisin, frankfurters, *Listeria monocytogenes*, microbial spoilage

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é reconhecida como um patógeno humano desde 1929 (NYFELDT, 1929 apud SLUTSKER e SCHUCHAT, 1999). Entretanto, apenas nas últimas décadas, investigações epidemiológicas importantes demonstraram que a listeriose podia ser causada pela ingestão de alimentos contaminados (SCHLECH et al., 1983). Até então, o modo de transmissão da doença permanecia obscuro. A infecção transplacentária e a aquisição direta da bactéria quando da passagem pelo canal vaginal durante o parto eram apontadas como as principais causas de listeriose perinatal. Entretanto, não se haviam identificado as prováveis fontes de infecção ou colonização da mãe. Similarmente, não se sabia, até aquele momento, quais eram as possíveis fontes ambientais de *L. monocytogenes* causadoras de meningite em adultos.

Mas um grande surto envolvendo 41 casos da doença (34 casos de listeriose perinatal e 7 casos de listeriose em adultos), ocorrido em 1981 nas províncias marítimas do Canadá, permitiu uma avaliação detalhada dos principais fatores de risco envolvidos na epidemiologia dessa enfermidade. Nesta ocasião, evidenciou-se a transmissão de *L. monocytogenes* por alimentos, neste caso em particular, por uma salada de repolho do tipo "cole slaw". O estudo ainda permitiu constatar que a contaminação do repolho foi decorrente do uso de adubo orgânico contendo esterco de ovelhas infectadas pela bactéria (SCHLECH et al., 1983). A partir de então, diversos alimentos passaram a ser identificados como veículos de transmissão do agente e em 1988, a Organização Mundial da Saúde finalmente reconheceu que o consumo de alimentos contaminados é a rota primária de transmissão da *L. monocytogenes* em humanos.

Trata-se de um microrganismo Gram positivo, anaeróbio facultativo, não esporulado, amplamente distribuído no meio ambiente, tendo sido isolado das mais variadas fontes tais como solos cultiváveis, lama, vegetação íntegra ou em decomposição, silagem, rios, lagos, águas residuais, efluentes de abatedouros e plantas processadoras de alimentos, mamíferos e aves domésticos ou selvagens,

insetos, peixes, crustáceos e até mesmo de geladeiras domésticas e industriais (FENLON, 1985; BRACKET, 1988; SKOVGAARD e NORRUNG, 1989).

Seres humanos e animais saudáveis podem atuar como portadores intestinais da bactéria, eliminando-a através das fezes. Estima-se que dois a 16% dos animais saudáveis, entre eles, bovinos, ovinos e suínos, albergam *L. monocytogenes* no trato intestinal, liberando-a através de seus excrementos (FARBER e PETERKIN, 1999).

Além do caráter ubiqüitário, esta bactéria apresenta algumas particularidades que a tornam de difícil controle tanto em alimentos como em plantas processadoras de alimentos.

É capaz de se multiplicar satisfatoriamente em ampla faixa de temperatura, inclusive em temperaturas de refrigeração, e apresenta-se mais resistente do que a maioria das bactérias não esporuladas a condições adversas ou tratamentos usados para o controle de patógenos de origem alimentar (FSIS, 2001).

Segundo DUGGAN e PHILLIPS (1998), *L. monocytogenes* é capaz de se multiplicar em temperaturas compreendidas entre - 0,4°C e 50°C. Quanto menor a temperatura, menor a velocidade de multiplicação, sendo que o limite mínimo, em condições ideais, para multiplicação do microrganismo é próximo de 0°C, com tempo de geração variando entre 62 e 131 horas (GILL e REICHEL, 1989).

Estudos realizados por GLASS e DOYLE (1989) demonstraram que *L. monocytogenes* pode se desenvolver em diversos produtos cárneos processados armazenados a 4,4°C, sendo que a taxa de multiplicação da bactéria está basicamente correlacionada ao tipo e ao pH do alimento estudado. O desenvolvimento a baixas temperaturas é ainda afetado por outros fatores tais como concentração de sal e presença de bactérias lácticas no alimento (BEUMER et al., 1996; McKELLAR et al., 1994).

Temperaturas abaixo de 0°C podem preservar ou inativar moderadamente a bactéria. Demonstrou-se que o microrganismo sobrevive por diversas semanas quando submetido ao congelamento a -18°C em diferentes alimentos, como

manteiga (OLSEN et al., 1988 apud ICMSF, 1996) e carne moída (KAYA e SCHMIDT, 1989 apud ICMSF, 1996). As taxas de sobrevivência e de injúria celular durante o congelamento dependem basicamente do substrato e da velocidade utilizada no processo (SWAMINATHAN, 2001).

Esse microrganismo ainda é capaz de se desenvolver em um amplo intervalo de pH, desde 4,39 até 9,40 (ICMSF, 1996) e na presença de concentrações variadas de cloreto de sódio e nitrito de sódio. Tem se constatado que *L. monocytogenes* é capaz de se multiplicar na presença de 10 a 12% de cloreto de sódio, podendo atingir altas populações quando exposta a concentrações moderadas de sal, tais como 6,5% (SWAMINATHAN, 2001). Pode ainda sobreviver a altas concentrações de cloreto de sódio por longos períodos. Quando há um decréscimo da temperatura de armazenamento do substrato, observa-se um aumento significativo da resistência do microrganismo às altas concentrações de sal presentes (SWAMINATHAN, 2001).

A inativação de *L. monocytogenes* por nitrito de sódio é afetada por diversos fatores, sendo o mais importante o pH do produto. McCLURE et al. (1991) demonstraram que em pH maior ou igual a 6,0, o nitrito, mesmo em concentrações de 400 µg/mL, tem atividade inibitória pequena contra *L. monocytogenes*. Entretanto, inibe-se a multiplicação da bactéria, em meio de cultura com 50 µg/mL de nitrito de sódio, quando o pH é menor ou igual a 5,3.

Apesar de todas essas particularidades, a listeriose é uma doença relativamente rara na América do Norte e Europa Ocidental, com uma taxa de incidência de aproximadamente 4 a 8 casos para cada 1.000.000 de indivíduos (FSIS, 2001). Nos Estados Unidos, aproximadamente 2.500 pessoas adoecem com listeriose a cada ano, com 2.322 hospitalizações e cerca de 500 óbitos (FSIS, 2001; MEAD et al., 1999). A prevalência da doença na África, Ásia e América do Sul é baixa ou até não existente, podendo ser reflexo das diferenças de hábitos alimentares e susceptibilidade do hospedeiro, ou mesmo, da falta de infra-estrutura para detecção da doença (ROCOURT, 1996).

A enfermidade acomete principalmente determinados grupos da população, tais como idosos acima de 60 anos, neonatos, gestantes e indivíduos imunodeprimidos. Diversas condições podem resultar em comprometimento do sistema imunológico como a infecção pelo vírus HIV, neoplasias diversas, alcoolismo, diabetes, cirrose hepática, enfermidades renais crônicas, transplantes de órgãos e uso de drogas imunossupressoras em geral (GELLIN e BROOME, 1989).

Assim, indivíduos saudáveis são pouco susceptíveis à enfermidade e, quando ela ocorre, manifesta-se como uma gripe ou nenhuma sintomatologia clínica é relatada. Já, a incidência da listeriose entre os indivíduos pertencentes aos grupos de risco é significativamente maior. Indivíduos com AIDS são 300 vezes mais acometidos pela doença quando comparados à população em geral (JENSEN et al., 1994). A incidência de listeriose relacionada à gravidez varia de 4.7 a 30 casos para cada 100.000 nascimentos. Entre indivíduos adultos, os pacientes transplantados são os que apresentam o maior risco de contrair a doença, com 200 casos para cada 100.000 transplantados, seguidos pelos pacientes com câncer (13 casos para cada 100.000 pacientes) (ROCOURT, 1996).

Apesar da baixa morbidade quando comparada a outras enfermidades transmitidas por alimentos, o quadro clínico associado à listeriose em indivíduos pertencentes a população de risco pode ser bastante severo, resultando em meningite, meningoencefalite e septicemia na maioria dos casos (SLUTSKER e SCHUCHAT, 1999). Mulheres grávidas podem adoecer em qualquer fase da gestação, mas a doença é freqüentemente adquirida no terceiro trimestre (SLUTSKER e SCHUCHAT, 1999). As gestantes em si não apresentam sintomatologia típica, sendo que em alguns casos, relatam um quadro clínico semelhante ao de uma gripe. Através da corrente sanguínea ou por infecção uterina ascendente, o microrganismo atinge o feto resultando em aborto espontâneo, nascimento de fetos prematuros, natimortos ou infectados. Quando há contaminação do neonato através da passagem pelo canal vaginal, pode ocorrer o desenvolvimento de meningite após 10 a 20 dias de vida (SCHLECH, 1996).

Devido a não realização rotineira de culturas bacterianas em casos de abortos espontâneos, é difícil estimar a proporção de perdas fetais atribuídas à

infecção por *L. monocytogenes* durante a gestação. A taxa global de mortalidade da doença é de aproximadamente 20 a 30% (GELLIN e BROOME, 1989; ICMSF, 1996; SWAMINATHAN, 2001). Em indivíduos imunodeprimidos e idosos, estes valores podem chegar a 38 a 45% (BÜLLA et al., 1995).

Os primeiros surtos da doença veiculados por alimentos descritos na literatura incriminavam vegetais, leite e queijos como potenciais veículos de transmissão do agente. Somente nos últimos dez anos foram registrados casos de listeriose humana associados ao consumo de carnes e produtos cárneos tais como patês e embutidos, entre eles, as salsichas (FARBER e PETERKIN, 1999).

Atualmente, sabe-se que certos alimentos processados prontos para consumo ("ready-to-eat") representam um alto risco de infecção para as populações susceptíveis à doença. Esses alimentos são comumente conservados através de refrigeração e apresentam vida-de-prateleira superior a 10 dias, permitindo que a população de *L. monocytogenes* aumente significativamente durante a estocagem (ROCOURT, 1996).

Em 1998, um grande surto envolvendo 22 estados americanos foi investigado. Cem pessoas adoeceram após o consumo de salsichas e "deli meats" contaminadas com uma cepa rara de *L. monocytogenes* sorotipo 4b, resultando em 21 mortes (CDC, 1999).

Os embutidos são alimentos amplamente consumidos em todo o mundo, reunindo características peculiares que estimulam a demanda crescente por parte dos consumidores, como diversidade de produtos, praticidade, palatabilidade e baixo custo. Em geral, os embutidos exigem pequeno tempo de preparo adequando-se à vida agitada dos consumidores, principalmente nas grandes cidades. São produtos baratos quando comparados a outras fontes alimentares de proteínas, sendo fabricados a partir de cortes cárneos de baixo valor comercial, aparas de carne e produtos secundários tais como miúdos comestíveis, gordura e carne mecanicamente separada de aves. Além dessas vantagens, apresentam bom valor nutricional pois contém quantidades significativas de carboidratos, proteínas de alto valor biológico, minerais essenciais como zinco e ferro, assim como

vitaminas, principalmente as do complexo B como o ácido fólico, a vitamina B6 e a vitamina B12 (NAKASHIMA, 2001).

Nos Estados Unidos, segundo o National Hot Dog & Sausage Council, em 2000 foram consumidos mais de 20 bilhões de "hot dogs", 9 bilhões dos quais foram comprados em mercados varejistas. Os consumidores americanos gastaram cerca de 1,6 trilhões de dólares comprando salsichas nos supermercados de todo o país (NATIONAL HOT DOG & SAUSAGE COUNCIL, 2001).

No Brasil, as salsichas são embutidos cárneos cozidos bastante populares com mercado cada vez mais promissor. A estimativa de consumo *per capita* é de 1,1 quilo de salsichas por ano, sendo atualmente considerado um dos embutidos mais consumidos no país (REVISTA NACIONAL DA CARNE, 2001).

Produtos cárneos cozidos, como as salsichas, deveriam ser isentos de *Listeria monocytogenes* (BEUMER et al., 1996). O processo térmico utilizado para a produção de embutidos cozidos é capaz de reduzir ou eliminar a população de *Listeria* spp. inicialmente presente. Devido a baixa contaminação geralmente encontrada nas carnes cruas utilizadas como matéria-prima, o processo de cozimento é considerado suficiente para garantir a segurança do produto (MACKEY et al., 1990).

A segurança do processamento térmico aplicado na produção de embutidos, especialmente salsichas, já foi constatada através de diversos estudos científicos. ZAIKA et al. (1990) prepararam salsichas contendo aproximadamente 10^8 UFC de *L. monocytogenes* Scott A por grama de emulsão cárnea. Após processamento térmico industrial padronizado (71,1°C ou 160°F no centro geométrico do produto), a população de *L. monocytogenes* foi reduzida em aproximadamente 1.000 vezes. Os autores concluíram, portanto, que o processo de cozimento proposto é capaz de eliminar os níveis de *L. monocytogenes* ($<10^3$ UFC/g) que normalmente são encontrados em emulsões cárneas cruas destinadas à fabricação de salsichas.

BERSOT et al. (2001) estudaram o comportamento da *L. monocytogenes* durante o processamento térmico industrial de mortadelas, observando também

uma redução de três ciclos logarítmicos do microrganismo após o tratamento térmico, em diferentes formulações do alimento.

Ao pesquisar a presença de *Listeria* spp. em salsichas vendidas a varejo nos Estados Unidos, WANG e MURIANA (1994) detectaram a presença da bactéria apenas no exsudato acumulado nas embalagens e não no interior do produto. Esses resultados corroboram as conclusões de outros autores, indicando que a presença de *Listeria monocytogenes* resulta de uma contaminação pós-processamento desses produtos e não da sobrevivência do microrganismo ao tratamento térmico aplicado.

Listeria monocytogenes pode adentrar em plantas processadoras de alimentos através dos calçados e vestimentas dos trabalhadores, equipamentos e utensílios provenientes de outros ambientes, matéria-prima crua de origem animal ou vegetal e, possivelmente, através de portadores humanos, podendo a partir daí, contaminar as superfícies de trabalho e esteiras de transporte de alimentos já processados. Durante a avaliação de uma planta produtora de salsichas, WENGER et al. (1990) demonstraram que a fase crítica para contaminação do produto pós-processamento térmico é o processo de depelagem (retirada das tripas artificiais utilizadas para embutimento da emulsão após o cozimento).

A incidência de *Listeria monocytogenes* em ambientes de plantas processadoras de carnes é alta (SLADE, 1992). Considerando que animais domésticos como bovinos, suínos e ovinos frequentemente albergam *Listeria monocytogenes* assintomaticamente em seu trato intestinal, não é de se surpreender que as pesquisas realizadas demonstrem não apenas a ubiquidade do patógeno como também seu caráter endêmico em abatedouros e plantas processadoras de carnes (GRAVANI, 1999). O ambiente úmido e refrigerado associado à frequente deposição de sólidos orgânicos nas superfícies de trabalho permitem a sobrevivência e multiplicação do patógeno em diferentes áreas de processamento, explicando assim a ocorrência de contaminação pós-processamento térmico (GRAVANI, 1999).

Uma pesquisa realizada em 40 plantas processadoras de produtos cárneos distribuídas pelo território americano demonstrou que em 21% das 2.300 amostras

ambientais analisadas detectou-se a presença de *Listeria* spp. Catorze áreas de processamento dessas indústrias apresentavam problemas de contaminação por *L. monocytogenes* ou outras *Listeria* spp., sendo que os principais pontos problemáticos foram pisos, ralos, valetas de escoamento, utensílios de limpeza (escovas, esponjas, vassouras, mangueiras, esfregões), superfícies de contato com alimentos (depeladeiras, fatiadores e esteiras de transporte) e áreas de lavagem de utensílios. Bactérias do gênero *Listeria* foram detectadas em 2,8, 14,5 e 25,5% das superfícies de contato com alimento examinadas antes, durante e após a produção de salsichas, respectivamente (GRAVANI, 1999).

É importante salientar que *Listeria monocytogenes* é capaz de formar biofilmes em diferentes superfícies de contato, incluindo aço inoxidável, borracha e vidro, presentes em uma indústria de alimentos, dificultando a limpeza dos equipamentos (MAFU et al., 1990).

Além dos surtos descritos na literatura, são também relatados muitos casos esporádicos de listeriose humana. Em 1988, o Center for Disease Control (CDC) realizou um estudo epidemiológico de vigilância ativa com o objetivo de estabelecer uma possível associação entre o consumo de determinados alimentos e a ocorrência de casos esporádicos de listeriose humana. O estudo demonstrou que o consumo de salsichas não cozidas e de carne de frango mal passada foi significativamente maior entre os indivíduos com listeriose quando comparado ao da população controle com padrão dietético similar. Concluiu-se que tais produtos deveriam ser incluídos na lista de alimentos potencialmente capazes de veicular o agente, com taxas de risco de 15% para salsichas não aquecidas e 6% para frango mal passado (SCHWARTZ et al., 1988).

Esses resultados foram recentemente corroborados pelo Food Safety and Inspection Service (FSIS) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, que também realizou uma análise de risco para diversos alimentos, entre eles salsichas. Foi possível constatar que o consumo de salsichas não aquecidas está associado a um dos maiores riscos de transmissão do agente, juntamente com os patês, pastas de carne e queijos frescos (FSIS, 2001).

Ao estudar registros científicos publicados em vários países do mundo sobre a prevalência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos, JAY (1996) observou que aproximadamente 16% dos produtos estudados estavam contaminados. Em geral, as carnes frescas continham populações inferiores a 100/g enquanto as maiores populações do patógeno foram encontradas em carnes processadas e produtos de frango. JOHNSON et al. (1990) afirmam que produtos cárneos prontos para o consumo podem estar contaminados com *L. monocytogenes* com uma incidência de até 50% em alguns casos. Uma pesquisa realizada no sul da Califórnia (EUA) revelou que 20% das salsichas vendidas a varejo estavam contaminadas com *L. monocytogenes* (WANG e MURIANA, 1994). No Brasil, 70% das amostras de salsichas analisadas por DESTRO et al. (1991) apresentavam-se contaminadas pelo microrganismo.

Além desses estudos de prevalência do patógeno em produtos cárneos, outras pesquisas realizadas comprovaram cientificamente que *L. monocytogenes* é capaz de se multiplicar em salsichas embaladas à vácuo mantidas sob refrigeração, tornando este produto potencialmente perigoso.

GLASS e DOYLE (1989) detectaram resultados conflitantes sobre a capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* em salsichas artificialmente contaminadas ($\sim 10^5$ *L. monocytogenes* por pacote) e armazenadas a 4,4°C durante seis semanas. Em uma das amostras analisadas, a população inicial de $7,9 \times 10^2$ NMP de *L. monocytogenes* por grama (dia zero) chegou a atingir $3,0 \times 10^5$ NMP/g do produto após seis semanas de armazenamento. Em salsichas de uma segunda planta processadora, contaminadas e estocadas nas mesmas condições descritas, a população de *L. monocytogenes* permaneceu praticamente constante. Os autores sugerem que essa diferença de comportamento possa ser decorrente do uso de fumaças líquidas com diferentes concentrações de compostos fenólicos (que apresentam atividade antimicrobiana contra *Listeria* spp.) na produção desses alimentos.

Ao analisar salsichas produzidas a partir de diferentes matérias-primas (carne bovina, carne de aves ou carnes bovina e suína) e estocadas a 5°C por 28 dias, McKELLAR et al. (1994) verificaram que de 61 amostras analisadas, 40

(65,6%) suportaram a multiplicação de *L. monocytogenes*, com um incremento médio de 1,26 ciclos logarítmicos da população após 14 dias de armazenamento.

Esses dados adquirem extrema relevância para a saúde pública quando consideramos que muitas pessoas consomem salsichas como aperitivo, sem aquecimento prévio, inclusive indivíduos de grupos de risco para listeriose como crianças, gestantes, idosos e indivíduos imunocomprometidos (WANG e MURIANA, 1994).

Outro importante aspecto a ser contemplado são as perdas econômicas geradas pela listeriose para todos os segmentos da sociedade, principalmente, para a própria indústria envolvida em um surto. Tais perdas estão relacionadas basicamente a custos médico-hospitalares, redução da produtividade, custos para recolhimento de lotes contaminados e destruição dos mesmos ("recalls"), investigações epidemiológicas para identificação da fonte de contaminação na indústria, custos adicionais de limpeza e sanificação da planta processadora e, principalmente, a diminuição da popularidade da marca e conseqüente redução das vendas, culminando até com o fechamento da empresa (ROBERTS e PINNER, 1990).

Em 1998, a empresa americana Sara Lee, responsável pela produção de lotes contaminados de salsichas envolvidos em um surto que afetou vários estados americanos, foi obrigada a realizar um dos maiores "recalls" da história, recolhendo e destruindo cerca de 15 milhões de libras (aproximadamente 7,5 milhões de quilos) de salsichas e "lunch meats", gerando prejuízo de 76 milhões de dólares (BOWERS, 2001).

Grandes perdas econômicas podem estar relacionadas também à qualidade do alimento produzido, especialmente à vida-de-prateleira do produto. A vida-de-prateleira de um alimento pode ser definida como o período no qual esse alimento ainda apresenta um nível de qualidade aceitável para ser consumido (LABUZA, 1982). Um produto com vida-de-prateleira pequena significa menor disponibilidade de venda do alimento ao consumidor e, portanto, diminuição dos lucros da empresa produtora.

Os produtos cárneos processados, tais como as salsichas, se deterioram principalmente devido ao desenvolvimento microbiano, oxidação de pigmentos e gorduras, exsudação e desidratação superficial (SARANTÓPOULOS et al., 1990). A forma predominante de deterioração é determinada pelas características do produto, pela contaminação microbiana inicial, pela temperatura de estocagem, pela higiene no processamento e manuseio e pelas características da embalagem e técnica de acondicionamento (SARANTÓPOULOS et al., 1990).

A velocidade de deterioração das salsichas está relacionada principalmente à temperatura de estocagem, sendo que quanto maior a temperatura, maior a velocidade de deterioração e portanto, menor a vida-de-prateleira do produto (MARINKOVIC, 1983 apud NAKASHIMA, 2001).

Os principais microrganismos envolvidos na deterioração desses produtos são as bactérias láticas, neste caso, selecionadas por uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos do alimento, como baixa temperatura de estocagem, presença de sais de cura e condições de microaerofilia determinadas pela embalagem a vácuo (DAVIES et al., 1999). Se por um lado as condições microaerófilas suprimem a multiplicação de bactérias deteriorantes tais como *Pseudomonas* e *Achromobacter*, por outro, permitem o desenvolvimento de anaeróbios aerotolerantes como lactobacilos e espécies de *Leuconostoc* (SARANTÓPOULOS et al., 1990). Outros grupos bacterianos são incapazes de predominar na deterioração de produtos cárneos embalados a vácuo apesar de serem isolados do produto (SARANTÓPOULOS et al., 1990).

Em estudo realizado por Von HOLY et al. (1991), lactobacilos homofermentativos e *Leuconostoc* spp. predominaram entre as bactérias isoladas de salsichas deterioradas, compreendendo juntos, 94,3% dos isolados bacterianos. A multiplicação de bactérias láticas nesses produtos pode explicar o desenvolvimento de limosidade superficial com exsudato leitoso, presença de gases no interior das embalagens e odores estranhos, sinais comumente observados em salsichas deterioradas (Von HOLY et al., 1991).

Ao avaliar a distribuição de bactérias láticas em plantas processadoras de salsichas, os mesmos pesquisadores observaram a predominância de *Lactobacillus* spp. homofermentativos (34%) entre as bactérias isoladas de amostras ambientais (Von HOLY et al., 1992). Segundo DYKES et al. (1991), as amostragens de linhas de embalagem em plantas processadoras indicaram que essas bactérias láticas contaminam o produto cozido em baixos números, como resultado do processo de manipulação e produção, mas as condições de estocagem permitem a multiplicação desses microrganismos, culminando com a deterioração do produto.

Na tentativa de minimizar perdas econômicas tão significativas, relacionadas tanto à segurança quanto à qualidade do produto, tem se sugerido a incorporação de novas tecnologias ao processamento industrial, entre elas, a utilização de bacteriocinas.

As bacteriocinas surgem em um cenário onde a prevenção da contaminação de salsichas por *L. monocytogenes* e sua conseqüente multiplicação durante a estocagem são dificultadas pela demanda por alimentos com níveis reduzidos de sal e conservadores por parte dos consumidores (FARBER e PERTERKIN, 1999).

As bacteriocinas são proteínas biologicamente ativas que exibem propriedades antimicrobianas contra espécies bacterianas intimamente relacionadas ("closely related") ao microrganismo produtor. Podem ser produzidas por diferentes bactérias, inclusive patogênicas, mas são as bacteriocinas das bactérias láticas que despertam maior interesse dos pesquisadores como potenciais conservadores biológicos para alimentos.

Até 1995, mais de 100 bacteriocinas de bactérias láticas já haviam sido identificadas. Em geral são pequenas proteínas catiônicas com ponto isoelétrico elevado e características anfífilas (BRUNO e MONTVILLE, 1993).

A nisina é a bacteriocina produzida por bactérias láticas melhor caracterizada até o momento. Foi descoberta na Inglaterra em 1928 e caracterizada por MATTICK e HIRSCH em 1947, quando então recebeu a denominação nisina. Naquela época, o microrganismo produtor, *Lactococcus lactis*, era então classificado como *Streptococcus lactis* do grupo N do esquema de sorotipagem de Lancefield e,

portanto, a denominação nisina originou-se da expressão "Group **N** Inhibitory Substance" (SCHLEIFER et al., 1985). Em 1951, HIRSCH et al. demonstraram seu potencial como conservador em alimentos e já, em 1953, a empresa Aplin & Barret Ltd. desenvolvia a primeira preparação de nisina para utilização interna da empresa, na tentativa de prevenir a deterioração de queijos processados por bactérias do gênero *Clostridium* (THOMAS et al., 2000). Entre 1962 e 1965, Aplin & Barret Ltd desenvolveu o produto Nisaplin® em escala comercial e em 1969, o Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares FAO/WHO reconheceu a substância como um conservador biológico seguro e legal para uso em alimentos (FAO/WHO, 1969). Finalmente, em 1988, o US Food and Drug Administration (FDA) reconheceu o status GRAS ("Generally Recognized As Safe") da nisina, permitindo seu uso como ingrediente da alimentação humana.

Lactococos produtores de nisina ocorrem naturalmente no leite cru e em queijos, e seres humanos e animais vêm consumindo esta bacteriocina há séculos, sem efeitos deletérios à saúde. Muitos estudos já constataram a ausência de toxicidade desta substância. Em 1962, pesquisadores japoneses investigaram a dose letal 50 (DL50) da substância em filhotes de ratos e gatos, e observaram que a nisina apresentava DL50 similar ao sal comum, aproximadamente 7 g/kg (HARA et al., 1962 apud. THOMAS, et al., 2000). Além disso, a nisina é rapidamente inativada pelas enzimas digestivas proteolíticas (pancreatina, α -quimiotripsina e subtilopeptidase) e portanto, não altera a microbiota intestinal dos consumidores (THOMAS et al., 2000).

A nisina consiste de um polipeptídeo pequeno, termoestável, composto por 34 aminoácidos, com cinco ligações tioéter e peso molecular de 3.353 dáltons quando na forma de monômero, mas, normalmente, é encontrada na forma de dímero (7 k-Da) ou tetrâmero (14 k-Da) (JUNG, 1991). Sua estrutura molecular, esquematizada na Figura 1, foi totalmente desvendada por GROSS e MORELL em 1971.

De acordo com a classificação de KLAENHAMMER (1993), a nisina pertence ao grupo I das bacteriocinas de bactérias lácticas ou grupo dos lantibióticos. Os lantibióticos são peptídeos ativos que contém aminoácidos raramente encontrados

na natureza como a lantionina (ALA-S-ALA) e β -metil-lantionina (ABA-S-ALA), além de outros aminoácidos modificados, tais como a deidroalanina e deidrobutirina (resíduos desidratados de serina e treonina). A lactocina 481, lactocina S e carnocina U149 possuem estruturas moleculares muito semelhantes a da nisina, e por tal motivo, também fazem parte deste grupo (KLAENHAMMER, 1993). O papel dos aminoácidos incomuns da nisina ainda não está bem determinado, mas há evidências de que os mesmos são importantes para sua propriedade e função. Modificações químicas dos resíduos desidratados por mercaptanos destroem a capacidade inibidora da substância (LIU et al., 1990).

Figura 1. Estrutura da nisina A (GROSS e MORELL, 1971)

Com relação às suas propriedades físico-químicas, a molécula de nisina apresenta natureza ácida e exibe sua maior estabilidade e solubilidade em valores baixos de pH (HURST, 1981). Em pH 2,5, sua solubilidade é de 12,5%, diminuindo para 4% em pH 5,0 e sendo praticamente insolúvel em pH neutro ou alcalino (HURST, 1981). Segundo LIU e HANSEN (1990), a solubilidade da nisina é de 57 mg/mL em pH 2,0, 1,5 mg/mL em pH 6,0 e 0,25 mg/mL em pH 8 a 12.

Com relação a estabilidade ao calor, TRAMER (1964) apud DELVES-BROUGHTON (1990) relatou que a nisina apresenta-se estável ao processo de esterilização em autoclave a 115,6°C em pH 2,0, mas observa-se 40% de perda de

atividade quando a substância está solubilizada em pH 5,0 e mais de 90% de perda quando o pH é de 6,8.

Há perda da atividade da nisina também durante a vida-de-prateleira dos alimentos, sendo que perdas mais pronunciadas são evidenciadas quanto maior o pH e a temperatura de armazenamento do produto (DELVES-BROUGHTON, 1990).

Os lantibióticos são, em geral, sintetizados nos ribossomos como precursores ou pré-peptídeos biologicamente inativos. Esses pré-peptídeos contêm uma sequência variável de aminoácidos, denominada sequência líder, que impede a atuação da bacteriocina sobre o próprio microrganismo produtor, funcionando como um mecanismo de imunidade. Após a tradução, os precursores são enzimaticamente modificados ocorrendo a formação de resíduos desidratados e o estabelecimento de ligações tio-éter (de VOS et al., 1995). São então exportados através da membrana citoplasmática e finalmente ativados através de clivagem proteolítica, perdendo a parte da molécula denominada sequência líder (de VOS et al., 1995; THOMAS et al., 2000). A nisina é produzida somente na fase exponencial do crescimento microbiano e sua biossíntese é auto-regulada (THOMAS et al., 2000).

Duas variantes naturais desta bacteriocina são conhecidas, nisina A e nisina Z (de VOS et al., 1993), sendo que uma cepa particular de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* é capaz de produzir apenas uma das variantes. A diferença principal entre essas duas variantes é a substituição da histidina na posição 27 da molécula de nisina A por asparagina na molécula de nisina Z (MULDERS et al., 1991).

Os extratos comerciais de nisina, como o Nisaplin®, são preparados utilizando-se cepas selvagens de *Lactococcus lactis* produtoras de nisina A sendo que 1 µg de nisina pura/grama (1mg/kg) equivale a 40 mg de Nisaplin®/kg. Com relação ao potencial específico desta preparação, cada grama de Nisaplin® contém 1×10^6 UI de nisina (THOMAS et al., 2000).

A maioria das bacteriocinas tem um espectro de ação limitado, sendo, em geral, efetivas somente contra bactérias estritamente relacionadas ao microrganismo produtor. A nisina, por exemplo, é ativa contra bactérias Gram

positivas, sendo incapaz de atuar sobre bactérias Gram negativas, bolores e leveduras (THOMAS et al., 2000).

O sítio primário de ação, tanto para nisina A como para nisina Z, é a membrana citoplasmática da célula bacteriana. A presença da membrana externa nas bactérias Gram negativas impede que a molécula de nisina atinja seu alvo principal. A membrana externa consiste de uma camada composta por fosfolipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos (LPS), que funciona como uma barreira impermeável, eficiente contra solutos hidrofóbicos e macromoléculas. Entretanto, a presença de poros nesta camada permite a difusão passiva de moléculas com peso molecular inferior a 600 daltons (ABEE et al., 1995).

Considerando que mesmo as bacteriocinas menores apresentam peso molecular de aproximadamente 3.000 daltons, esses compostos são incapazes de atravessar a membrana externa e atingir a membrana citoplasmática das bactérias Gram negativas (KLAENHAMMER, 1993).

Para ampliar o espectro de ação dessas substâncias, tem-se investigado o uso de agentes quelantes como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido etilenoglicoltetracético (EGTA), citrato e fosfato em combinação com a nisina para inativação de bactérias Gram negativas tais como *Salmonella* spp. e cepas patogênicas de *Escherichia coli*. Estas substâncias promovem a remoção de cátions divalentes presentes na membrana externa, como por exemplo magnésio (Mg^{2+}), que contribuem para a estabilidade da camada lipopolissacarídica (LPS) dessa membrana. Com a retirada desses cátions, ocorre a liberação das moléculas de LPS e desestabilização da membrana externa, permitindo a passagem de moléculas de nisina, que atingirão, assim, a membrana citoplasmática como mostra a Figura 2 (HELANDER et al., 1997).

Figura 2. Esquema de atuação de agentes quelantes sobre cátions divalentes da camada LPS da membrana externa de bactérias Gram negativas (HELANDER et al., 1997).

A natureza flexível da molécula de nisina bem como suas propriedades anfifílicas (porção N-terminal hidrofóbica e C-terminal hidrofílica) são muito importantes para a atividade antimicrobiana da substância (THOMAS et al., 2000). Acredita-se que, como molécula catiônica, a nisina é capaz de interagir através de forças iônicas com os fosfolípidos da membrana carregados negativamente (BREUKINK et al., 1997) iniciando então o processo de inserção na bicamada lipídica e formação de poros. Este processo ainda não está totalmente elucidado. Dois mecanismos diferentes de formação de poros são propostos: modelo "barrel-stave" e modelo "wedge". Ambos propõem que a ligação da nisina à membrana alvo se dá através de interações eletrostáticas, sendo que a principal diferença entre os modelos refere-se à maneira como a molécula é inserida na bicamada lipídica (MONTVILLE e CHEN, 1998).

O mecanismo "barrel-stave" sugere a adesão e inserção dos monômeros de nisina à membrana citoplasmática, com orientação perpendicular à mesma. Os monômeros se agregam lateralmente formando poros (MONTVILLE e CHEN, 1998). As porções hidrofóbicas da molécula mantêm-se voltadas para a membrana enquanto as porções hidrofílicas ficam voltadas para o lúmen do poro então formado. A energia necessária para formação dos poros é fornecida pelo potencial transmembrana do próprio microrganismo. Por isso, o efeito letal da nisina é otimizado em células em multiplicação e com membranas completamente energizadas (THOMAS et al., 2000).

Já o modelo "wedge" propõe a ligação de diversas moléculas de nisina à superfície aniônica da membrana citoplasmática através de interações eletrostáticas. A alta concentração dessas moléculas provoca uma tensão localizada na bicamada lipídica e a nisina é então puxada para o interior da membrana por ação de um dos componentes da força motriz protônica celular (PMF), formando poros transitórios (MONTVILLE e CHEN, 1998).

Os dois esquemas propostos para formação de poros em membranas citoplasmáticas celulares pela ação da nisina estão esquematizados na Figura 3.

A formação de poros na membrana citoplasmática das células vegetativas acarretará no efluxo de íons potássio, fosfato inorgânico, aminoácidos e ATP intracelular culminando com a dissipação da força motriz protônica (PMF).

A PMF consiste em um gradiente eletroquímico gerado por dois componentes distintos: gradiente de pH (ΔpH) e potencial transmembrana ($\Delta\psi$). Esses gradientes servem como uma força diretriz para muitos processos celulares vitais dependentes de energia (MONTVILLE et al., 1995). A força motriz protônica possui papel essencial para síntese de ATP, transporte ativo de proteínas e movimentação bacteriana (BRUNO e MONTVILLE, 1993; NICHOLLS e FERGUNSON, 1992).

A nisina é capaz de dissipar completamente ambos os componentes celulares da PMF, culminando com a lise das células vegetativas (BRUNO e MONTVILLE, 1993).

Figura 3. Modelos de formação de poros em membrana citoplasmática de células sensíveis à bacteriocina : (A) "wedge-like" e (B) "barrel-stave" (ROSA, 2001).

Esta bacteriocina apresenta também atividade pronunciada contra esporos de bactérias Gram positivas. Tem sido proposto que a nisina modifica grupos sulfidrila das proteínas de membrana dos esporos recém-germinados, inibindo as etapas subsequentes do desenvolvimento do esporo (De VUYST e VANDAMME, 1994). Na verdade, a aplicação pioneira da nisina direcionava-se particularmente a inibição de bactérias deteriorantes esporuladas do gênero *Clostridium* em queijos e posteriormente, observou-se sua atividade também contra células vegetativas.

O uso de nisina já é permitido em mais de 45 países em diversos alimentos como queijos processados, sobremesas lácteas, leites, alimentos enlatados, bebidas alcoólicas, gelo para estocagem de peixes, comida para bebês, entre outros (DELVES-BROUGHTON, 1990).

Em 1998, o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em atitude pioneira, autorizou

a utilização de Nisaplin® na superfície externa de salsichas através da publicação da Autorização de Uso de Produto AUP/DOI/DIPOA nº 563/98 (BRASIL, 1998). Este documento permite a aplicação de 200 ppm de Nisaplin® em solução de ácido fosfórico grau alimentício por aspersão ou imersão do alimento na solução.

A eficiência da nisina em produtos alimentícios pode ser influenciada por uma série de fatores como alterações na solubilidade e na carga das bacteriocinas, interações com componentes do alimento, inativação por proteases e mesmo alterações celulares dos microrganismos alvo como resposta a fatores ambientais (GÄNZLE et al., 1999). É importante considerar a matriz alimentícia onde se pretende atuar, já que os componentes de um alimento podem exercer tanto efeitos antagonistas como efeitos sinérgicos sobre a eficiência antimicrobiana das bacteriocinas. De acordo com GÄNZLE et al. (1999), emulsificantes neutros estimulam a atividade da nisina mas a lecitina exerce efeitos antagonísticos a essa bacteriocina, assim como a presença de caseína e de cátions divalentes.

A inibição de microrganismos patogênicos Gram positivos e aumento da vida útil de produtos lácteos e alimentos termoprocessados através da aplicação de nisina já está bem documentada na literatura. O controle do estufamento tardio por *Clostridium butyricum* e *C. tyobutyricum* pela adição de nisina ao leite tem sido realizado com sucesso em vários tipos de queijos desde a década de 40 (MORENO et al., 1999).

Já os resultados relacionados à eficiência da nisina em produtos cárneos são variáveis e dependem principalmente do sistema cárneo estudado.

Inicialmente, as pesquisas em sistemas cárneos estavam centralizadas na redução dos níveis de nitrito de sódio em carnes curadas, sem comprometer a segurança microbiológica desses produtos.

Ao avaliar o efeito antibotulínico da nisina em bacon, TAYLOR & SOMERS (1985) concluíram que 100 a 150 ppm de nisina em combinação com 120 ppm de nitrito eram necessárias para proporcionar proteção adicional de uma semana ao produto, garantindo sua inocuidade.

Estudos mais recentes têm investigado a eficiência da nisina em carnes cruas e produtos cárneos cozidos, com atenção especial à inibição de *Listeria monocytogenes* e microrganismos deteriorantes nesses alimentos.

PAWAR et al. (2000) avaliaram o efeito da nisina em combinação com cloreto de sódio na sobrevivência de *L. monocytogenes* em carne crua de búfalo artificialmente contaminada estocada a 4°C durante 16 dias. Os autores evidenciaram que a inibição do patógeno é proporcional a porcentagem de nisina adicionada ao produto, sendo que o efeito inibitório foi mais pronunciado nas amostras tratadas com 800 UI/mL de nisina quando comparado ao efeito observado nas amostras tratadas com 400 UI/mL de nisina. A adição de 2% de cloreto de sódio não aumentou significativamente a eficiência da nisina neste sistema cárneo.

CUTTER e SIRAGUSA (1994) demonstraram que a aspersão de nisina (5.000 UA/mL) sobre carne bovina artificialmente inoculada resultou em redução imediata da população de *Listeria innocua* e *Brochotrix thermosphacta*, de aproximadamente 2 log UFC/cm² e até 3 log UFC/cm², respectivamente.

ARIYAPITIPUN et al. (1999) compararam os efeitos isolados e combinados de diferentes compostos antimicrobianos (ácido láctico a 2%, ácido polilático de baixo peso molecular a 2% e de 200 UI/mL de nisina em HCl 0,02N e nos ácidos anteriormente citados) sobre diversos grupos bacterianos em carne bovina crua embalada a vácuo e armazenada a 4°C por 56 dias. A aplicação da nisina em ácido polilático a 2%, nisina em ácido láctico a 2% e apenas ácido láctico reduziu significativamente a população microbiana de bactérias aeróbias psicrotróficas, bactérias da família *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* spp e *Pseudomonas* spp. As outras combinações de tratamento não resultaram em efeitos inibitórios significativos.

DAVIES et al. (1999) estudaram a eficiência da nisina no controle da deterioração, por bactérias lácticas, de mortadelas embaladas a vácuo e estocadas a 8°C. Os autores avaliaram também a interferência de componentes do alimento como teor de gordura (15, 25 e 37%) e presença de emulsificantes (ortofosfato, difosfato e trifosfato) sobre a atividade da bacteriocina. O melhor efeito inibitório da

bacteriocina foi observado em amostras contendo 25% de gordura e utilizando difosfato trisódico como agente emulsificante. A adição de 25 µg de nisina/grama aumentou significativamente a vida-de-prateleira do produto. Enquanto as amostras não tratadas deterioraram após sete dias de estocagem ($>10^8$ UFC de bactérias láticas/g) , as mortadelas tratadas ainda não estavam deterioradas após 50 dias de estocagem.

Dada a escassez de dados sobre a eficiência de nisina em produtos cárneos cozidos e a sua autorização pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para utilização nesse tipo de produto, decidimos estudar a sobrevivência de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas, bactérias láticas e *Listeria monocytogenes* em salsichas tratadas com nisina e armazenadas sob refrigeração (8°C) e abuso de temperatura (12°C).

2. OBJETIVOS

A presente pesquisa teve como objetivos principais :

- 1.) Avaliar a eficiência da nisina empregada conforme recomendado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento no controle do desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* em salsichas artificialmente contaminadas e armazenadas sob refrigeração (8°C) e condições de abuso de temperatura (12°C).
- 2.) Avaliar a eficiência da adição de nisina à superfície de salsichas no prolongamento da vida-de-prateleira do produto quando estocado a 8°C e 12°C, através do monitoramento da multiplicação da microbiota deteriorante normalmente presente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e transporte das amostras

As amostras de salsichas foram fornecidas por uma pequena planta processadora, portadora de registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF), situada na cidade de São Paulo. As salsichas foram produzidas sem a adição de carne suína e a emulsão cárnea formada em "cutter" foi embutida manualmente em tripas artificiais. Após processamento térmico industrial em estufas de cozimento, as salsichas foram depeladas e mantidas em câmara de resfriamento em caixas plásticas até o dia seguinte, quando eram tingidas e embaladas manualmente.

As salsichas, fornecidas pela empresa antes de serem embaladas, eram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e transportadas até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em caixas isotérmicas contendo gelo. Após a chegada do material, iniciavam-se imediatamente os procedimentos de tratamento, contaminação artificial e análise do produto.

3.2 Preparo das soluções de ácido fosfórico e de nisina

Utilizou-se o produto Nisaplin® (1.000.000 UI de nisina/g), comercializado por Applin & Barret Ltd. e gentilmente cedido por B.V. Representações. Uma solução contendo 200 ppm de Nisaplin® em solução de ácido fosfórico grau alimentício foi preparada de acordo com o estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através da Autorização de Uso de Produto AUP Nº 563/98. Para o preparo da solução de ácido fosfórico grau alimentício, padronizou-se a utilização de 01 (um) grama de ácido fosfórico (85%) (ALBRIGHT & WILSON PAAD Ltd.) para cada litro de água destilada estéril. Após a homogeneização das soluções, foram retiradas alíquotas de 50 ml para mensuração do pH em Medidor de pH Digimed, modelo DMPH-2 (Digimed, Brasil). Para a

utilização das soluções, os valores de pH deveriam estar entre 2,0 e 3,0, faixa de maior solubilidade do produto.

3.3 Preparo das suspensões contendo *Listeria monocytogenes*

Para o estudo da sobrevivência de *L. monocytogenes* frente ao tratamento com nisina, utilizou-se a cepa *L. monocytogenes* Scott A resistente a cloranfenicol e eritromicina cedida pelo Dr. Thomas J. Montville da Rutgers – The State University of New Jersey, EUA. Esta cepa é originária da North Caroline State University, Raleigh, EUA, e carrega o plasmídeo pGK12 que codifica resistência aos antibióticos citados (FOEGEDING et al., 1992).

Foram preparados dois níveis de inóculo denominados INÓCULO BAIXO e INÓCULO ALTO. Para tanto, transferiu-se a cultura de *L. monocytogenes* Scott A antibiótico resistente, com auxílio de uma alça, para tubos contendo caldo infusão cérebro-coração (BHI – CM375, Oxoid) suplementado com 0,5 ppm de eritromicina (Sigma) e 5 ppm de cloranfenicol (Sigma), incubando-os a 35°C por 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, mensurou-se a densidade óptica do caldo em espectrofotômetro Ultraspec 2000® (Pharmacia Biotech, England) utilizando-se o comprimento de onda de 600 nm. Aliquotas de 1,25 mL do caldo BHI contendo *L. monocytogenes* foram transferidas para quatro erlenmeyers contendo 250 mL de caldo soja triptona (TSB – CM129, Oxoid) suplementado com 0,6% de extrato de levedura (YE – L21, Oxoid) e as mesmas concentrações de cloranfenicol e eritromicina descritas acima, totalizando 1.000 mL de caldo inoculado (TSB-YE ATB).

Após incubação a 35°C por 18 a 24 horas, realizou-se nova mensuração de densidade óptica a 600 nm, e 1 (um) mL do caldo TSB-YE ATB foi transferido para 1000 mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v) estéril em uma cuba de aço inoxidável estéril, obtendo-se uma suspensão com aproximadamente 10⁵ UFC/mL de *L. monocytogenes*, denominada de INÓCULO BAIXO.

O restante do caldo inoculado foi submetido à centrifugação a 5000 x g (equivalente a 5500 rpm) sob refrigeração (4°C) durante 15 minutos em Centrífuga Sorvall[®], modelo RC5C (Du PONT, Newtown, CT). O sobrenadante foi então desprezado e o resíduo ressuspenso em 1.000 mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v) estéril e novamente centrifugado nas condições anteriormente descritas. O procedimento de lavagem das células foi realizado duas vezes, objetivando a retirada total de qualquer composto pertencente ao meio de cultura utilizado para o cultivo das células. Em seguida, todo o volume da suspensão foi transferido para uma cuba de aço inoxidável estéril, obtendo-se uma suspensão com aproximadamente 10⁸ UFC/mL de *L. monocytogenes*, denominada de INÓCULO ALTO.

Após o procedimento descrito, retirava-se uma alíquota de cada suspensão celular preparada e realizavam-se diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% e semeadura em superfície em Ágar Palcam (Palcam Agar Base - CM877, Oxoid, suplementado com Palcam Selective Supplement - SR150E, Oxoid) e Ágar Soja Triptona (TSA - CM131, Oxoid) suplementado com 0,6% de extrato de levedura (YE - L21, Oxoid) e antibióticos (0,5 ppm de eritromicina e 5 ppm de cloranfenicol, Sigma), para confirmação da população bacteriana presente na suspensão. As placas foram incubadas invertidas a 37°C por 48 horas.

Os procedimentos descritos para o preparo do inóculo estão esquematizados na figura 4.

Figura 4. Procedimentos adotados para o preparo dos inóculos alto e baixo utilizados para contaminação artificial das salsichas.

3.4. Tratamento das salsichas com solução de nisina

Já no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, as salsichas foram divididas em dois grandes grupos designados GRUPO TRATADO e GRUPO NÃO TRATADO, cada grupo contendo 88 unidades do produto.

Todos os procedimentos destinados ao tratamento e contaminação artificial das amostras foram realizados no interior de capela de fluxo laminar vertical.

As salsichas do GRUPO TRATADO foram colocadas em cestos retangulares perfurados estéreis e imersas na solução de Nisaplin[®], preparada conforme descrito em 3.2., durante 60 segundos, enquanto as amostras do GRUPO NÃO TRATADO foram imersas, pelo mesmo período, apenas em solução de ácido fosfórico grau alimentício a 0,1%.

3.5. Contaminação artificial das salsichas

Após imersão em nisina, as amostras do GRUPO TRATADO foram divididas em três subgrupos distintos:

SUBGRUPO TRATADO NÃO INOCULADO: após o tratamento, 32 salsichas foram imediatamente acondicionadas, duas a duas, em embalagens estéreis e embaladas à vácuo, totalizando 16 pacotes do produto. Este subgrupo foi destinado ao estudo da eficiência da ação da nisina sobre microrganismos deteriorantes naturalmente presentes durante a estocagem do produto.

SUBGRUPO TRATADO INOCULADO (INÓCULO BAIXO): após imersão em solução de Nisaplin[®], 28 salsichas tratadas foram imersas em suspensão de células de *L. monocytogenes* denominada INÓCULO BAIXO durante 60 segundos, atingindo-se uma contaminação superficial de 10^3 a 10^4 UFC/cm² do produto, e embaladas, duas a duas, a vácuo.

SUBGRUPO TRATADO INOCULADO (INÓCULO ALTO): Outras 28 salsichas foram imersas em suspensão celular denominada INÓCULO ALTO pelo mesmo

período de tempo, obtendo-se um nível de contaminação superficial de 10^6 a 10^7 UFC/cm² do produto, e então duas unidades do produto foram transferidas assepticamente para embalagem plástica e embaladas a vácuo.

Os subgrupos TRATADO INOCULADO foram destinados ao estudo da eficiência do tratamento com nisina em salsichas artificialmente inoculadas com *Listeria monocytogenes*.

O mesmo procedimento foi realizado para as amostras do GRUPO NÃO TRATADO. Os subgrupos descritos foram divididos e armazenados em duas temperaturas distintas, 8°C e 12°C, durante 42 dias.

Para o acondicionamento do produto a vácuo, utilizaram-se, em todos os grupos estudados, embalagens *Barrier Bag* multicamadas (BB-200) com espessura de 56 micras, permeabilidade máxima ao oxigênio de 30 cm³/m².dia a 23°C e permeabilidade máxima ao vapor d'água de 10g/cm².dia a 38°C, fornecidas pela CRYOVAC Sealed Air Corporation. Para obtenção do vácuo no interior das embalagens, utilizou-se uma seladora Engevac[®], modelo 20 L (Engevac, Brasil).

Os procedimentos utilizados para tratamento e contaminação artificial das amostras estão esquematizados na Figura 5.

3.6 Avaliação da eficiência da ação da nisina sobre *Listeria monocytogenes* em salsichas artificialmente contaminadas

A enumeração das populações de *L. monocytogenes* em salsichas artificialmente contaminadas foi realizada a cada sete dias (dias zero, 7, 14, 21, 28, 35 e 42) até o final do período de armazenamento estipulado (42 dias).

Para tanto, a amostra, correspondente a duas salsichas inteiras, foi transferida para sacos de polietileno estéreis (Whirl-Pak[®] – Nasco) e adicionou-se 200 mL de água peptonada a 0,1% estéril como diluente. As amostras foram mantidas em agitador Incubator Shaker, modelo Innova[™] 4000 (New Brunswick Scientific, EUA) a 140 rpm a 30°C durante 5 minutos. Imediatamente após esta

etapa, realizaram-se diluições decimais seriadas e alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas superficialmente em placas de Ágar Palcam (Palcam Agar Base - CM877, Oxoid, suplementado com Palcam Selective Supplement - SR150E, Oxoid) e Ágar Soja Triptona (TSA - CM131, Oxoid) suplementado com 0,6% de extrato de levedura (YE - L21, Oxoid) e antibióticos (0,5 ppm de eritromicina e 5 ppm de cloranfenicol, Sigma) em duplicata. O inóculo foi espalhado com auxílio de alça de Drigalski e as placas foram incubadas invertidas a 35°C por 48 horas. Após a contagem das colônias, determinou-se o número de UFC/mL do líquido de lavagem e calculou-se o número de UFC/cm² dividindo-se o número de UFC/mL por 0,8729. Essa constante corresponde à relação entre a área média das salsichas (87,29 cm²) e o volume do líquido de lavagem adicionado para cada uma delas (100 mL). As médias das duplicatas foram calculadas e os resultados expressos em log UFC/cm².

3.7 Avaliação da eficiência da ação da nisina sobre microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos e bactérias lácticas.

A enumeração das populações de bactérias aeróbias mesófilas, psicrotróficas e bactérias lácticas foi realizada nos dias zero, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 do período de estocagem.

3.7.1. Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas

Uma unidade analítica de 25g foi retirada assepticamente de cada pacote de salsichas e diluída com 225 mL de água peptonada a 0,1% estéril em saco plástico de polietileno (Whirl-Pak® - Nasco). A amostra foi homogeneizada em Laboratory Blender Stomacher 400 (Seward Medical, England) por um minuto. Diluições decimais seriadas foram preparadas e transferidas (alíquotas de 1 mL) para placas de Petri vazias em duplicata. A seguir, adicionou-se cerca de 15 mL de Ágar Padrão para Contagem (PCA - CM325, Oxoid) previamente dissolvido e resfriado a 45° C. Após homogeneização e completa solidificação do ágar, as placas foram incubadas

invertidas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas (MATURIN e PEELER, 1995). As médias das duplicatas foram calculadas e os resultados expressos em log UFC/g.

3.7.2. Enumeração de bactérias aeróbias psicrotróficas

A partir das diluições decimais seriadas, inoculou-se 0,1 mL na superfície de placas de Petri contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA – CM325, Oxoid) em duplicata. Com auxílio de uma alça de Drigalski, o inóculo foi distribuído por toda a superfície do ágar até sua completa absorção. As placas foram incubadas invertidas a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 dias (MATURIN & PEELER, 1995). As médias das duplicatas foram calculadas e os resultados expressos em log UFC/g.

3.7.3. Enumeração de bactérias lácticas

A partir das diluições seriadas, transferiram-se alíquotas de 1 mL de cada diluição para placas de Petri vazias, em duplicata. A seguir, adicionou-se cerca de 15 mL de Ágar de Man, Rogosa & Sharpe (MRS – CM361, Oxoid) previamente dissolvido e resfriado a 45°C . A amostra foi adequadamente homogeneizada e após a completa solidificação, as placas foram incubadas a 30°C durante 48 horas em jarra de anaerobiose Merck® contendo indicador de anaerobiose e sistema de exaustão de oxigênio (Anaerogen®- Oxoid)(VEDAMUTHU et al., 1992). As médias das duplicatas foram calculadas e os resultados expressos em log UFC/g.

3.8. Análise estatística

Para verificar se existia diferença estatisticamente significativa (nível de 5% de significância) entre as populações dos microrganismos estudados em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, ajustou-se um modelo de análise de variância (ANOVA) para cada uma das variáveis de interesse.

As variáveis de interesse propostas foram:

- **Fatores:** temperatura (8°C e 12°C), grupo (tratado e não tratado) e tempo de armazenamento. Para o estudo da eficiência da ação da nisina sobre *L. monocytogenes*, considerou-se ainda o fator inóculo (baixo e alto).
- **Interações:** temperatura x grupo, temperatura x dia, grupo x dia, temperatura x grupo x dia. Para o estudo da eficiência da ação da nisina sobre *L. monocytogenes*, ainda foram consideradas as interações de 1º ordem, grupo x inóculo e dia x inóculo, além das possíveis interações de 2ª e 3ª ordem.

Após a análise de variância, realizaram-se comparações múltiplas pelo método de Tukey (NETER et al., 1996) mantendo um nível de significância global de 5%.

Para a realização dessas análises, foram utilizados os programas computacionais Microsoft Excel for Windows, versão 2000 e Minitab for Windows, versão 13.

Figura 5. Esquema de tratamento, contaminação e distribuição dos subgrupos para cada lote de salsichas analisado

4. RESULTADOS

4.1. Valores de pH das soluções de ácido fosfórico e de nisina

A tabela 1 apresenta os valores de pH da solução de ácido fosfórico grau alimentício e da solução de Nisaplin[®] utilizadas nas quatro repetições genuínas do experimento.

Tabela 1. Valores de pH das soluções de 200 ppm de Nisaplin em ácido fosfórico grau alimentício a 0,1% e solução de ácido fosfórico grau alimentício a 0,1% utilizadas nas quatro repetições genuínas do experimento.

Repetições	Valores de pH	
	Solução de Nisaplin [®]	Solução de ácido fosfórico
A	2,25	2,27
B	2,24	2,20
C	2,32	2,18
D	2,16	2,22

4.2. Populações médias de *Listeria monocytogenes* presentes nas suspensões bacterianas utilizadas para a contaminação artificial das salsichas.

A tabela 2 apresenta as populações médias de *L. monocytogenes* presentes nas suspensões bacterianas denominadas INÓCULO BAIXO e INÓCULO ALTO, preparadas conforme descrito no item 3.3 e utilizadas nas quatro repetições

genuínas do experimento. As densidades ópticas a 600 nm dos caldos TSB-YE ATB utilizados para o preparo das suspensões bacterianas variaram entre 1,068 e 1,286.

Tabela 2. Populações médias de *Listeria monocytogenes* (log UFC/mL) presentes nas suspensões bacterianas, inóculo baixo e inóculo alto, utilizadas nas quatro repetições genuínas do experimento.

Repetições	<i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/mL)	
	INÓCULO BAIXO	INÓCULO ALTO
A	5,4	8,6
B	5,7	8,5
C	5,7	8,7
D	5,7	8,7

4.3. Avaliação da eficiência da ação da nisina sobre microrganismos deteriorantes naturalmente presentes em salsichas armazenadas a 8°C.

As tabelas 3 a 8 apresentam os resultados obtidos em cada uma das quatro repetições genuínas realizadas quanto à enumeração de microrganismos mesófilos (tabelas 3 e 4), bactérias lácticas (tabelas 5 e 6) e microrganismos psicrótrópicos (tabelas 7 e 8) em salsichas tratadas e não tratadas, armazenadas a 8°C durante 42 dias. Os resultados estão expressos em log UFC/g do produto.

Já, as tabelas 9 a 11 apresentam média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação dos resultados, para cada um dos grupos de microrganismos deteriorantes enumerados, em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, armazenadas a 8°C durante 42 dias. Esses resultados estão apresentados também através das figuras 6, 7 e 8.

No produto não submetido ao tratamento com nisina, a população de microrganismos mesófilos inicialmente encontrada variou entre 4,9 e 6,6 log UFC/g com média de $5,6 \pm 0,8$ log UFC/g (tabelas 4 e 9). No produto tratado com 200 ppm de Nisaplin[®], as populações variaram entre 4,4 a 5,7 log UFC/g do produto, com média de $5,0 \pm 0,5$ log UFC/g (tabelas 3 e 9).

Ao considerarmos os valores médios encontrados, nota-se uma diferença de 0,6 log UFC de microrganismos mesófilos por grama do produto imediatamente após o tratamento. Com o avançar da vida-de-prateleira, os valores médios das populações de microrganismos mesófilos foram praticamente os mesmos nos produtos tratados e não tratados (tabela 9 e figura 6).

Já no terceiro dia de armazenamento, as populações de microrganismos mesófilos atingiram valores médios de 6,1 log UFC/g (produto tratado) a 6,2 log UFC/g (produto não tratado) e continuaram se desenvolvendo, atingindo populações ao redor de 8 log UFC/g a partir do 14º dia de estocagem (tabela 9 e figura 6).

A mesma tendência pode ser observada ao analisarmos as populações de bactérias lácticas e microrganismos psicotróficos presentes nesses alimentos.

No dia zero de estocagem, ou seja, imediatamente após a realização do tratamento com a solução de bacteriocina, as populações de bactérias lácticas variaram entre 3,0 e 5,1 log UFC/g, para salsichas tratadas e 2,9 a 6,0 log UFC/g para salsichas não tratadas (tabelas 5 e 6). Nota-se uma diferença de 0,5 log UFC/g dos valores médios das populações, ao compararmos o produto tratado ($4,0 \pm 1,2$ log UFC/g) e não tratado ($4,5 \pm 1,3$ log UFC/g). Assim como os microrganismos mesófilos, as bactérias lácticas se desenvolveram rapidamente, atingindo valores próximos a 8 log UFC/g a partir do 14º dia de estocagem a 8°C (tabela 10 e figura 7)

As populações de microrganismos psicotróficos variaram de 4,2 a 4,6 log UFC/g em salsichas tratadas e 4,0 a 5,9 log UFC/g no produto não tratado no primeiro dia do experimento (tabelas 7 e 8). Pode-se observar uma diferença de 0,5 log UFC/g entre as populações médias de microrganismos psicotróficos presentes

em salsichas tratadas e não tratadas com nisina imediatamente após o tratamento (dia zero) (tabela 11). Da mesma forma como foi observado para os microrganismos mesófilos e bactérias láticas, as populações se igualaram durante o armazenamento do produto, atingindo 8 log UFC/g no 14º dia de armazenamento (tabela 11 e figura 8).

4.4. Avaliação da eficiência da ação da nisina sobre microrganismos deteriorantes naturalmente presentes em salsichas armazenadas a 12°C.

As tabelas 12 a 17 apresentam os resultados obtidos em cada uma das quatro repetições genuínas realizadas quanto à enumeração de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e bactérias láticas em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, armazenadas a 12°C durante 42 dias. Os resultados estão expressos em log UFC/g do produto.

A média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação desses resultados estão expressos nas tabelas 18 a 20. Esses resultados podem ser comparados graficamente através das figuras 9, 10 e 11.

As populações iniciais de microrganismos mesófilos (dia zero) variaram entre 4,8 a 6,0 log UFC/g em salsichas tratadas, com média de $5,2 \pm 0,6$ log UFC/g, e de 4,6 a 6,1 log UFC/g do produto não tratado, com média de $5,5 \pm 0,6$ log UFC/g. Observou-se, portanto, uma diferença de 0,3 log UFC/g do produto quando comparamos o valor médio das populações em amostras tratadas e não tratadas com nisina (tabelas 12, 13 e 18).

Já no terceiro dia de estocagem, as populações bacterianas atingiram valores ao redor de 8 log UFC/g do produto em ambos os grupos (tratado e não tratado) e se mantiveram em valores dessa magnitude até o final do período de armazenamento (figura 9).

Os resultados referentes à ação da nisina sobre bactérias láticas e microrganismos psicrotróficos nessas condições de armazenamento são bastante

semelhantes aos descritos para microrganismos mesófilos. A população inicial de bactérias lácticas em salsichas tratadas variou entre 3,3 e 5,7 log UFC/g, com média de $4,2 \pm 1,1$ log UFC/g e, para salsichas não tratadas, entre 3,8 a 6,1 log UFC/g, com média de $4,7 \pm 1,1$ log UFC/g do produto (tabelas 14, 15 e 19 e figura 10).

Para os microrganismos psicrotróficos, a população variou entre 4,2 e 4,8 log UFC/g, com média de $4,6 \pm 0,3$ log UFC/g para salsichas tratadas e de 4,0 a 5,5 log UFC/g em salsichas não tratadas, com média de $4,9 \pm 0,6$ log UFC/g (tabelas 16, 17 e 20 e figura 11).

O tratamento por imersão na solução de nisina promoveu uma redução média imediata de 0,5 log UFC/g sobre as bactérias lácticas e de 0,2 log UFC/g sobre os microrganismos psicrotróficos.

Para um nível de significância de 5%, a redução das populações de microrganismos mesófilos, bactérias lácticas e microrganismos psicrotróficos ocasionada pelo tratamento com nisina não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em ambas as condições de armazenamento propostas.

Independentemente da utilização da nisina, a análise estatística comprovou o efeito da temperatura de armazenamento sobre a taxa de multiplicação dos microrganismos deteriorantes estudados, demonstrando que o desenvolvimento dessa microbiota em salsichas estocadas a 8°C foi estatisticamente menor ao observado em salsichas armazenadas a 12°C até o 7º dia de estocagem. A partir da segunda semana (14º dia), as populações não diferiram estatisticamente em ambas as condições de temperatura propostas.

4.5. Avaliação da eficiência da ação da nisina sobre *Listeria monocytogenes* em salsichas artificialmente contaminadas e armazenadas a 8°C.

Os resultados referentes à avaliação da eficiência da ação da nisina sobre *Listeria monocytogenes* em salsichas artificialmente contaminadas e armazenadas a 8°C estão apresentados nas tabelas 22 a 25.

As tabelas 26 e 27 apresentam os cálculos de média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação, realizados a partir dos resultados obtidos em quatro repetições genuínas para *L. monocytogenes* em salsichas armazenadas a 8°C. Esses resultados estão apresentados também nas figuras 12 a 14.

Os resultados obtidos em Ágar PALCAM foram estatisticamente iguais aos obtidos em Ágar Soja Triptona suplementado com 0,6% de extrato de levedura e os antibióticos eritromicina e cloranfenicol ($p < 0,05$) em ambas as condições de armazenamento propostas, denotando que o tratamento com nisina não provocou injúria celular capaz de impedir a recuperação em ágar seletivo das células remanescentes.

O tratamento com nisina ocasionou a redução imediata de 0,7 log UFC de *L. monocytogenes*/cm² do produto, quando o alimento foi contaminado através de imersão em suspensão bacteriana denominada INÓCULO BAIXO. A população inicial de *L. monocytogenes* enumerada no produto tratado variou entre 2,4 a 3,4 log UFC/cm², com média de $3,0 \pm 0,5$ log UFC/cm², enquanto no produto não tratado, enumerou-se uma população inicial de 3,2 a 4,1 log UFC/cm², com média de $3,7 \pm 0,4$ log UFC/cm² (tabelas 21, 22 e 25).

Durante todo o período de armazenamento, as populações de *L. monocytogenes* foram menores em salsichas tratadas com nisina quando comparadas às populações presentes no produto não tratado.

A redução imediata após o tratamento com nisina foi menos intensa quando o produto recebeu uma carga de contaminação maior (10^6 a 10^7 UFC/cm²), sendo

observada uma diferença média de 0,3 log UFC de *L. monocytogenes*/cm². Neste caso, a população de *L. monocytogenes* no dia zero variou entre 6,4 a 6,7 log UFC/cm² (com média de $6,5 \pm 0,1$ log UFC/cm²) para o produto tratado e entre 6,7 a 7,0 log UFC/cm² (com média de $6,8 \pm 0,2$ log UFC/cm²) para o produto não tratado (tabelas 23, 24 e 26).

Durante o armazenamento a 8°C, as populações de *L. monocytogenes* presentes permaneceram praticamente constantes, sem multiplicação significativa do microrganismo, com uma tendência à diminuição da população nas últimas semanas de armazenamento em ambos os grupos.

4.6. Avaliação da eficiência da ação da nisina sobre *Listeria monocytogenes* em salsichas artificialmente contaminadas e armazenadas a 12°C.

As tabelas 27 a 30 apresentam as populações de *L. monocytogenes* enumeradas em quatro repetições genuínas do experimento em salsichas artificialmente contaminadas, tratadas e não tratadas com nisina.

A média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação dos resultados obtidos durante a avaliação da sobrevivência de *L. monocytogenes* em salsichas submetidas ao tratamento com nisina e armazenadas a 12°C estão demonstrados nas tabelas 31 e 32 e figuras 13 e 15. Os resultados estão expressos em log UFC/cm².

Quando as salsichas foram submetidas à contaminação superficial através da imersão em inóculo baixo, o tratamento com nisina resultou em redução média imediata de 0,5 log UFC/cm² da população no dia zero. Neste caso, a população de *L. monocytogenes* variou entre 2,6 e 3,7 log UFC/cm² (média de $3,1 \pm 0,5$ log UFC/cm²) para o produto tratado e entre 2,9 a 4,1 log UFC/cm² (média de $3,6 \pm 0,5$ log UFC/cm²) para o produto não tratado (tabelas 27, 28 e 31). Já na primeira semana de estocagem, as populações de *L. monocytogenes* presentes em salsichas tratadas praticamente se igualaram às presentes no alimento não tratado. Apesar

da estocagem dos produtos em condições de abuso de temperatura (12°C), as populações de *L. monocytogenes* não se multiplicaram significativamente durante o período de estocagem.

Na avaliação da eficiência da ação da nisina sobre altas populações de *L. monocytogenes* (10^6 a 10^7 UFC/cm²), pode-se observar que a redução imediata ocasionada pela utilização da bacteriocina foi menos intensa, sendo de 0,3 log UFC/cm². A população permaneceu praticamente constante em ambos os grupos até a 4ª semana de estocagem, com uma tendência a diminuição nas 5ª e 6ª semanas de armazenamento.

Os resultados obtidos pela análise de variância (ANOVA) demonstraram que o nível de contaminação inicial do alimento bem como a temperatura em que o produto é estocado interferem significativamente sobre a eficiência do tratamento com nisina preconizado.

A população média de *L. monocytogenes* foi estatisticamente menor apenas em salsichas tratadas, artificialmente contaminadas com populações menores do microrganismos (10^3 a 10^4 UFC/cm²) e armazenadas a 8°C. As populações de *L. monocytogenes* em salsichas tratadas com nisina e armazenadas a 12°C não diferiram estatisticamente das populações enumeradas em salsichas não tratadas, independentemente da carga microbiana inicialmente imposta ao produto. Isso demonstra que a elevada carga microbiana de um produto bem como as altas temperaturas de armazenamento influenciam negativamente sobre a eficiência desta bacteriocina.

Tabela 3. Populações médias de microrganismos mesófilos em salsichas tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias.

Tempo (dias)	Microrganismos mesófilos (log₁₀ UFC/g)			
	Rep.* A	Rep. B	Rep. C	Rep. D
Zero	5,1	5,7	4,4	4,8
3	6,0	7,6	5,0	5,9
7	6,6	8,2	7,1	7,9
14	8,1	8,4	7,9	8,6
21	8,1	8,9	7,7	8,7
28	8,1	9,4	7,8	8,6
35	8,2	9,8	7,8	9,0
42	7,9	8,2	7,8	8,6

* Rep.: repetição genuína

Tabela 4. Populações médias de microrganismos mesófilos em salsichas não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias.

Tempo (dias)	Microrganismos mesófilos (log₁₀ UFC/g)			
	Rep.* A	Rep. B	Rep. C	Rep. D
Zero	5,2	6,6	4,9	5,9
3	6,2	7,6	5,3	5,6
7	7,2	7,8	7,2	7,9
14	8,3	8,5	8,2	8,4
21	8,5	8,9	8,4	8,3
28	8,9	9,4	8,1	8,2
35	8,8	8,8	8,5	8,7
42	8,4	8,3	8,4	8,4

* Rep.: repetição genuína

Tabela 5. Populações médias de bactérias láticas em salsichas tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias .

Tempo (dias)	Bactérias láticas (log₁₀ UFC/g)			
	Rep.* A	Rep. B	Rep. C	Rep. D
Zero	3,1	4,9	3,0	5,1
3	5,0	6,7	4,4	5,6
7	6,4	8,2	7,4	7,3
14	8,0	8,3	8,6	8,7
21	7,9	9,0	8,8	8,7
28	8,8	9,4	8,8	8,9
35	8,7	10,0	8,4	8,9
42	7,9	8,1	8,6	8,7

* Rep. : repetição genuína

Tabela 6. Populações médias de bactérias láticas em salsichas não tratadas com risina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias.

Tempo (dias)	Bactérias láticas (log₁₀ UFC/g)			
	Rep.* A	Rep. B	Rep. C	Rep. D
Zero	2,9	6,0	4,0	5,1
3	6,0	6,9	4,7	5,4
7	7,2	7,9	7,7	7,6
14	8,2	8,4	8,9	8,8
21	8,3	8,9	8,8	8,3
28	8,9	9,4	8,7	8,6
35	8,5	8,9	8,8	8,7
42	8,6	8,3	8,7	8,6

* Rep. : repetição genuína

Tabela 7. Populações médias de microrganismos psicrotróficos em salsichas tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias.

Tempo (dias)	Microrganismos psicrotróficos (log₁₀ UFC/g)			
	Rep.* A	Rep. B	Rep. C	Rep. D
Zero	4,5	4,6	4,2	4,4
3	5,7	6,8	5,1	6,1
7	7,0	8,1	7,5	8,0
14	8,4	8,3	8,5	8,8
21	8,7	8,4	8,8	8,8
28	8,9	9,1	8,7	9,0
35	9,0	8,7	8,7	9,0
42	8,5	8,3	8,8	8,7

* Rep. : repetição genuína

Tabela 8. Populações médias de microrganismos psicrotróficos em salsichas não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias.

Tempo (dias)	Microrganismos psicrotróficos (log₁₀ UFC/g)			
	Rep.* A	Rep. B	Rep. C	Rep. D
Zero	4,4	5,9	4,0	5,3
3	6,3	7,0	5,4	6,1
7	7,6	8,0	7,7	7,7
14	8,5	8,1	8,8	8,9
21	8,5	8,8	8,7	8,5
28	8,3	8,2	8,7	8,6
35	8,4	8,5	9,0	8,7
42	8,1	8,2	8,8	8,6

* Rep. : repetição genuína

Tabela 9. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de microrganismos mesófilos enumeradas nas diferentes repetições genuínas do experimento em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias.

Tempo (dias)	TRATADO			NÃO TRATADO		
	média	SD	CV	média	SD	CV
Zero	5,0	0,5	10,7	5,6	0,8	13,4
3	6,1	1,1	17,3	6,2	1,0	16,7
7	7,5	0,7	9,6	7,5	0,4	5,2
14	8,3	0,3	3,8	8,3	0,1	1,5
21	8,4	0,5	6,4	8,5	0,3	3,1
28	8,5	0,7	8,1	8,7	0,6	7,3
35	8,7	0,9	10,0	8,7	0,2	1,8
42	8,1	0,4	4,5	8,4	0,0	0,4

Tabela 10. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de bactérias lácticas enumeradas nas diferentes repetições genuínas do experimento em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias.

Tempo (dias)	TRATADO			NÃO TRATADO		
	média	SD	CV	média	SD	CV
Zero	4,0	1,2	28,6	4,5	1,3	29,5
3	5,4	1,0	18,2	5,8	0,9	16,0
7	7,3	0,7	9,8	7,6	0,3	3,8
14	8,4	0,3	3,7	8,6	0,3	3,8
21	8,6	0,5	5,5	8,6	0,3	3,6
28	9,0	0,3	3,4	8,9	0,3	3,9
35	9,0	0,7	7,7	8,7	0,2	1,9
42	8,3	0,4	4,7	8,6	0,2	1,9

Tabela 11. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de microrganismos psicrotróficos enumeradas nas diferentes repetições genuínas do experimento em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C durante 42 dias.

Tempo (dias)	TRATADO			NÃO TRATADO		
	média	SD	CV	média	SD	CV
Zero	4,4	0,2	3,7	4,9	0,9	18,1
3	5,9	0,7	11,9	6,2	0,7	10,8
7	7,6	0,5	6,3	7,7	0,2	2,1
14	8,5	0,2	2,8	8,6	0,4	4,2
21	8,7	0,2	2,1	8,6	0,1	1,6
28	8,9	0,2	1,8	8,4	0,3	3,1
35	8,9	0,2	2,0	8,7	0,2	2,8
42	8,6	0,2	2,8	8,4	0,3	4,1

Tabela 12. Populações médias de microrganismos mesófilos em salsichas tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C durante 42 dias.

Tempo (dias)	Microrganismos mesófilos ($\log_{10}$ UFC/g)			
	Rep.* A	Rep. B	Rep. C	Rep. D
Zero	5,1	6,0	4,9	4,8
3	8,1	8,5	7,4	8,6
7	8,4	8,4	8,6	8,2
14	8,3	8,4	8,6	8,3
21	8,4	8,9	8,8	8,1
28	8,9	9,4	8,7	8,6
35	8,2	9,4	8,7	8,3
42	7,9	8,1	8,3	8,4

* Rep. : repetição genuína

Tabela 13. Populações médias de microrganismos mesófilos em salsichas não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C durante 42 dias.

Tempo (dias)	Microrganismos mesófilos (log ₁₀ UFC/g)			
	Rep.* A	Rep. B	Rep. C	Rep. D
Zero	5,6	6,1	4,6	5,6
3	7,6	8,3	7,7	8,2
7	8,3	8,6	8,4	8,4
14	8,4	8,2	8,4	8,3
21	8,4	8,9	8,5	7,9
28	8,9	9,4	8,3	8,8
35	8,5	8,7	8,6	8,3
42	8,2	8,5	8,1	8,0

* Rep. : repetição genuína

Tabela 14. Populações médias de bactérias lácticas em salsichas tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C durante 42 dias.

Tempo (dias)	Bactérias lácticas (log ₁₀ UFC/g)			
	Rep.* A	Rep. B	Rep. C	Rep. D
zero	3,7	5,7	3,3	4,3
3	7,7	8,4	8,1	8,4
7	8,4	8,4	9,0	8,3
14	8,3	8,4	8,9	8,5
21	8,4	8,9	9,0	8,1
28	8,9	9,4	8,9	8,7
35	8,2	9,7	8,9	8,5
42	8,1	8,1	8,5	8,5

* Rep. : repetição genuína

Tabela 15. Populações médias de bactérias láticas em salsichas não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C durante 42 dias.

Tempo (dias)	Bactérias láticas (log ₁₀ UFC/g)			
	Rep.* A	Rep. B	Rep. C	Rep. D
zero	3,8	6,1	3,8	5,2
3	7,6	8,1	8,0	8,2
7	8,1	8,5	8,5	8,5
14	8,4	8,2	8,7	8,5
21	8,4	8,9	8,7	8,1
28	8,9	9,5	8,6	8,8
35	8,5	8,9	8,7	8,5
42	8,1	8,4	8,4	8,3

* Rep. : repetição genuína

Tabela 16. Populações médias de microrganismos psicrotróficos em salsichas tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C durante 42 dias.

Tempo (dias)	Microrganismos psicrotróficos (log ₁₀ UFC/g)			
	Rep.* A	Rep. B	Rep. C	Rep. D
zero	4,2	4,8	4,7	4,5
3	7,8	8,0	8,4	7,9
7	8,4	8,2	8,8	8,3
14	8,4	8,2	8,7	8,2
21	8,7	8,5	8,9	8,0
28	8,3	8,4	8,8	8,3
35	8,1	8,7	8,6	8,7
42	7,4	7,6	8,4	8,6

* Rep. : repetição genuína

Tabela 17. Populações médias de microrganismos psicrotróficos em salsichas não tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C durante 42 dias.

Tempo (dias)	Microrganismos psicrotróficos ($\log_{10}$ UFC/g)			
	Rep.* A	Rep. B	Rep. C	Rep. D
zero	4,0	5,5	4,8	5,1
3	7,6	7,8	8,2	7,6
7	8,1	8,3	8,8	8,5
14	8,4	8,1	8,7	8,7
21	8,1	8,5	8,6	8,1
28	8,5	7,9	8,6	8,5
35	8,1	8,4	8,6	7,7
42	7,3	7,3	8,3	8,5

Rep.* : repetição genuína

Tabela 18. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de microrganismos mesófilos enumeradas nas diferentes repetições genuínas do experimento em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C.

Tempo (dias)	TRATADO			NÃO TRATADO		
	média	SD	CV	média	SD	CV
zero	5,2	0,6	11,0	5,5	0,6	11,8
3	8,2	0,5	6,4	7,9	0,3	4,3
7	8,4	0,2	1,8	8,4	0,1	1,4
14	8,4	0,1	1,5	8,3	0,1	1,3
21	8,6	0,3	4,1	8,4	0,4	5,0
28	8,9	0,3	3,6	8,9	0,5	5,2
35	8,7	0,6	6,5	8,5	0,2	2,1
42	8,2	0,2	2,3	8,2	0,2	2,4

Tabela 19. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de bactérias lácticas enumeradas nas diferentes repetições genuínas do experimento em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C durante 42 dias.

Tempo (dias)	TRATADO			NÃO TRATADO		
	média	SD	CV	média	SD	CV
zero	4,2	1,1	24,8	4,7	1,1	23,7
3	8,2	0,3	3,8	8,0	0,3	3,5
7	8,5	0,3	3,6	8,4	0,2	2,3
14	8,5	0,3	3,3	8,4	0,2	2,7
21	8,6	0,4	4,5	8,6	0,3	3,8
28	9,0	0,3	3,2	8,9	0,4	4,2
35	8,8	0,6	7,2	8,7	0,2	2,4
42	8,3	0,2	2,9	8,3	0,1	1,5

Tabela 20. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de microrganismos psicrotróficos enumeradas nas diferentes repetições genuínas do experimento em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C.

Tempo (dias)	TRATADO			NÃO TRATADO		
	média	SD	CV	média	SD	CV
zero	4,6	0,3	5,6	4,9	0,6	12,7
3	8,0	0,2	3,0	7,8	0,3	3,3
7	8,4	0,3	3,1	8,4	0,3	3,4
14	8,4	0,2	2,8	8,5	0,3	3,5
21	8,5	0,4	4,5	8,3	0,3	3,0
28	8,4	0,2	2,8	8,4	0,3	3,8
35	8,5	0,3	3,3	8,2	0,4	4,9
42	8,0	0,6	7,3	7,9	0,7	8,3

Figura 6. Populações médias de microrganismos mesófilos naturalmente presentes em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas à vácuo e armazenadas a 8°C (■ Não Tratado e ◆ Tratado).

Figura 7. Populações médias de bactérias lácticas naturalmente presentes em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas à vácuo e armazenadas a 8°C (■ Não Tratado e ◆ Tratado).

Figura 8. Populações médias de microrganismos psicrotróficos naturalmente presentes em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas à vácuo e armazenadas a 8°C (■ Não Tratado e ◆ Tratado).

Figura 9. Populações médias de microrganismos mesófilos naturalmente presentes em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas à vácuo e armazenadas a 12°C (■ Não Tratado e ◆ Tratado).

Figura 10. Populações médias de bactérias lácticas naturalmente presentes em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas à vácuo e armazenadas a 12°C (■ Não Tratado e ◆ Tratado).

Figura 11. Populações médias de microrganismos psicrótrópicos naturalmente presentes em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas à vácuo e armazenadas a 12°C (■ Não Tratado e ◆ Tratado).

Tabela 21. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^3 a 10^4 UFC/cm²), tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento.

<i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/cm ²)											
Tempo (dias)	Repetição A		Repetição B		Repetição C		Repetição D		TSA	Palcam	média
	Palcam ^a	TSA ^b	média*	Palcam	TSA	média	Palcam	TSA			
zero	3,2	3,7	3,4	3,3	3,1	3,2	2,8	3,1	2,9	2,4	2,4
7	2,8	3,2	3,0	2,8	3,1	3,0	3,1	3,2	3,2	2,4	2,4
14	3,2	3,3	3,3	3,1	3,1	3,1	2,8	2,9	2,8	2,7	2,6
21	3,1	3,1	3,1	3,2	3,3	3,3	3,0	3,0	3,0	2,9	2,8
28	3,1	3,3	3,2	3,2	3,5	3,3	2,8	3,0	2,9	2,9	2,9
35	3,1	3,1	3,1	2,7	2,8	2,7	2,7	2,8	2,7	2,8	2,8
42	3,2	ND	3,2	2,8	2,8	2,8	2,5	2,8	2,6	2,8	2,8

^a Palcam : Ágar Base PALCAM (CM877 - Oxoid)

^b TSA : Ágar Soja Tryptona (CM131 - Oxoid) suplementado com 0,6% de extrato de levedura e antibióticos (eritromicina e cloranfenicol).

* **média**: média aritmética das contagens obtidas para cada meio de cultura utilizado

ND: não determinado

Tabela 22. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^3 a 10^4 UFC/cm²) não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento.

<i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/cm ²)											
Tempo (dias)	Repetição A			Repetição B			Repetição C			Repetição D	
	Palcam ^a	TSA ^b	média*	Palcam	TSA	média	Palcam	TSA	média	Palcam	TSA
zero	3,7	3,9	3,8	4,0	4,2	4,1	3,8	3,7	3,7	3,2	3,1
7	3,6	3,7	3,6	3,3	3,4	3,3	3,7	3,7	3,7	3,1	3,0
14	3,2	3,1	3,2	3,4	3,5	3,4	3,5	3,5	3,5	3,0	3,0
21	3,1	3,1	3,1	3,3	3,5	3,4	3,7	3,7	3,7	3,1	3,0
28	3,2	3,1	3,1	3,2	3,4	3,3	3,6	3,6	3,6	3,2	3,1
35	2,8	2,9	2,9	3,2	3,5	3,3	3,2	3,3	3,2	3,1	3,0
42	2,9	3,2	3,0	3,2	3,5	3,3	3,2	3,2	3,2	3,2	3,1

^a Palcam : Ágar Base PALCAM (CM877 - Oxoid)

^bTSA : Ágar Soja Triptona (CM131 - Oxoid) suplementado com 0,6% de extrato de levedura e antibióticos (eritromicina e cloranfenicol).

***média:** média aritmética das contagens obtidas para cada meio de cultura utilizado

Tabela 23. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^6 a 10^7 UFC/cm²), tratadas com solução de Nisaplin[®] em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento.

<i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/cm ²)											
Tempo (dias)	Repetição A			Repetição B			Repetição C			Repetição D	
	Palcam ^a	TSA ^b	média*	Palcam	TSA	média	Palcam	TSA	média	Palcam	TSA
zero	6,6	6,6	6,6	6,4	6,3	6,4	6,5	6,7	6,6	6,6	6,6
7	6,2	6,2	6,2	6,3	6,2	6,3	6,7	6,6	6,6	6,5	6,6
14	6,1	6,2	6,2	6,3	6,4	6,3	6,5	6,5	6,5	6,4	6,5
21	6,1	6,2	6,2	6,0	6,2	6,1	6,5	6,6	6,6	6,2	6,3
28	6,2	6,4	6,3	6,5	6,5	6,5	6,1	6,1	6,1	6,2	6,4
35	6,0	6,1	6,1	5,8	6,1	6,0	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3
42	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,3	6,2	5,7	5,9
											5,8

^aPalcam : Ágar Base PALCAM (CM877 - Oxoid)

^bTSA : Ágar Soja Triptona (CM131 - Oxoid) suplementado com 0,6% de extrato de levedura e antibióticos (eritromicina e cloranfenicol)

***média:** média aritmética das contagens obtidas para cada meio de cultura utilizado

Tabela 24. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^6 a 10^7 UFC/cm²), não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento.

<i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/cm ²)											
Tempo (dias)	Repetição A			Repetição B			Repetição C			Repetição D	
	Palcam ^a	TSA ^b	média*	Palcam	TSA	média	Palcam	TSA	média	Palcam	TSA
zero	6,7	6,6	6,6	7,1	6,9	7,0	6,7	6,7	6,7	6,8	6,7
7	6,1	6,3	6,2	6,5	6,5	6,5	6,6	6,7	6,7	6,5	6,5
14	6,4	6,5	6,4	6,2	6,3	6,3	6,7	6,6	6,6	6,6	6,6
21	6,3	6,5	6,4	6,4	6,3	6,4	6,7	6,6	6,6	6,6	6,5
28	6,6	6,7	6,6	6,4	6,4	6,4	6,4	6,5	6,5	6,3	6,4
35	6,1	6,1	6,1	5,3	6,6	5,9	6,2	6,3	6,3	6,2	6,3
42	5,9	6,1	6,0	6,0	6,1	6,0	6,2	6,3	6,2	5,7	5,8

^aPalcam : Ágar Base PALCAM (CM877 - Oxoid)

^bTSA : Ágar Soja Triptona (CM131 - Oxoid) suplementado com 0,6% de extrato de levedura e antibióticos (eritromicina e cloranfenicol).

***média**: média aritmética das contagens obtidas para cada meio de cultura utilizado

Tabela 25. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de *L. monocytogenes* (10^3 a 10^4 UFC/cm²) enumeradas em quatro repetições genuínas do experimento em salsichas embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C.

Tempo (dias)	TRATADO			NÃO TRATADO		
	Média	SD	CV	média	SD	CV
zero	3,0	0,5	15,6	3,7	0,4	10,6
7	2,9	0,3	10,8	3,4	0,3	8,6
14	3,0	0,3	10,2	3,3	0,2	7,5
21	3,0	0,2	5,9	3,3	0,3	9,3
28	3,1	0,2	7,6	3,3	0,2	6,6
35	2,8	0,2	6,4	3,1	0,2	6,7
42	2,9	0,3	8,7	3,2	0,1	3,8

Tabela 26. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de *L. monocytogenes* (10^6 a 10^7 UFC/cm²) enumeradas em quatro repetições genuínas do experimento em salsichas embaladas a vácuo e armazenadas a 8°C.

Tempo (dias)	TRATADO			NÃO TRATADO		
	média	SD	CV	média	SD	CV
zero	6,5	0,1	1,5	6,8	0,2	2,2
7	6,4	0,2	3,4	6,5	0,2	2,7
14	6,4	0,1	2,1	6,5	0,2	2,5
21	6,3	0,2	3,3	6,5	0,1	1,9
28	6,3	0,2	2,6	6,5	0,1	1,7
35	6,2	0,2	2,7	6,1	0,2	2,6
42	6,0	0,2	3,0	6,0	0,2	3,3

Tabela 27. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^3 a 10^4 UFC/cm²) tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento.

<i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/cm ²)											
Tempo (dias)	Repetição A		Repetição B		Repetição C		Repetição D				média
	Palcam ^a	TSA ^b	Palcam	TSA	Palcam	TSA	Palcam	TSA	Palcam	TSA	
zero	3,7	3,7	3,4	3,3	2,9	2,9	2,7	2,5			2,6
7	4,7	4,9	3,4	3,6	3,5	3,5	3,1	3,0			3,0
14	4,3	4,2	3,1	3,1	3,3	3,4	3,5	3,6			3,6
21	4,2	ND	3,2	3,2	3,4	3,4	3,3	3,2			3,2
28	3,1	3,2	3,1	3,3	3,1	3,3	3,1	3,1			3,1
35	3,2	3,2	2,1	2,4	3,1	3,2	3,1	3,0			3,0
42	2,1	ND	2,4	ND	2,5	2,8	3,0	2,8			2,9

^aPalcam : Ágar Base PALCAM (CM877 - Oxoid)

^bTSA : Ágar Soja Tryptona (CM131 - Oxoid) suplementado com 0,6% de extrato de levedura e antibióticos (eritromicina e cloranfenicol).

***média:** média aritmética das contagens obtidas para cada meio de cultura utilizado

ND: não determinado.

Tabela 28. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^3 a 10^4 UFC/cm²), não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento.

<i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/cm ²)										
Tempo (dias)	Repetição A		Repetição B		Repetição C		Repetição D			
	Palcam ^a	TSA ^b	média*	Palcam	TSA	média	Palcam	TSA	média	
zero	3,7	3,7	3,7	4,0	4,1	4,1	3,7	3,7	3,7	3,1 2,8 2,9
7	3,7	3,5	3,6	3,7	3,7	3,7	3,8	3,8	3,8	3,5 3,3 3,4
14	3,4	3,5	3,4	3,5	3,4	3,4	3,8	3,6	3,7	3,9 3,5 3,7
21	2,8	3,0	2,9	3,4	3,4	3,4	3,8	3,7	3,8	3,9 3,7 3,8
28	2,7	ND	2,7	3,4	3,4	3,4	3,8	3,8	3,8	3,3 3,2 3,3
35	2,9	3,1	3,0	2,9	2,8	2,9	3,6	3,8	3,7	3,4 3,1 3,2
42	3,1	ND	3,1	2,8	3,0	2,9	3,3	3,3	3,3	3,6 3,2 3,4

^aPalcam : Ágar Base PALCAM (CM877 - Oxoid)

^bTSA : Ágar Soja Triptona (CM131 - Oxoid) suplementado com 0,6% de extrato de levedura e antibióticos (eritromicina e cloranfenicol).

***média**: média aritmética das contagens obtidas para cada meio de cultura utilizado

ND: não determinado

Tabela 29. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^6 a 10^7 UFC/cm²), tratadas com solução de Nisaplin® em ácido fosfórico grau alimentício 0,1%, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento.

<i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/cm ²)											
Tempo (dias)	Repetição A			Repetição B			Repetição C			Repetição D	
	Palcam ^a	TSA ^b	média	Palcam	TSA	média	Palcam	TSA	média	Palcam	TSA
zero	6,5	6,5	6,5	6,9	6,8	6,8	6,5	6,5	6,5	6,6	6,7
7	7,2	7,1	7,1	6,6	6,5	6,5	6,6	6,7	6,7	7,0	7,1
14	6,9	6,8	6,9	6,2	6,2	6,2	6,6	6,6	6,6	7,0	7,0
21	6,7	6,8	6,8	6,4	6,2	6,3	7,0	6,9	6,9	7,1	7,0
28	5,3	5,5	5,4	6,0	6,0	6,0	6,7	6,8	6,8	6,4	6,5
35	6,2	6,6	6,4	5,9	6,1	6,0	6,7	6,7	6,7	6,5	6,4
42	5,9	5,7	5,8	5,8	5,9	5,9	6,6	6,4	6,5	6,3	6,2

^aPalcam : Ágar Base PALCAM (CM877 - Oxoid)

^bTSA : Ágar Soja Triptona (CM131 - Oxoid) suplementado com 0,6% de extrato de levedura e antibióticos (eritromicina e cloranfenicol)

***média:** média aritmética das contagens obtidas para cada meio de cultura utilizado

Tabela 30. Populações médias de *L. monocytogenes* Scott A em salsichas artificialmente contaminadas (10^6 a 10^7 UFC/cm²), não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C por 42 dias nas quatro repetições genuínas do experimento.

<i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/cm ²)											
Tempo (dias)	Repetição A			Repetição B			Repetição C			Repetição D	
	Palcam ^a	TSA ^b	média*	Palcam	TSA	média	Palcam	TSA	média	Palcam	TSA
zero	6,6	6,3	6,4	7,0	6,8	6,9	6,6	6,7	6,6	6,8	6,8
7	6,7	6,7	6,7	6,4	6,4	6,4	6,9	6,8	6,8	6,9	7,0
14	6,4	6,5	6,4	6,2	6,2	6,2	6,8	6,7	6,7	6,7	6,7
21	6,4	6,2	6,3	6,3	6,3	6,3	6,7	6,7	6,7	7,0	7,0
28	5,3	5,5	5,4	6,0	6,2	6,1	6,7	6,8	6,7	6,6	6,6
35	5,1	5,2	5,1	6,1	6,1	6,1	6,7	6,7	6,7	6,6	6,7
42	5,1	5,5	5,3	5,5	5,5	5,5	6,4	6,6	6,5	6,5	6,5

^aPalcam : Ágar Base PALCAM (CM877 - Oxoid)

^bTSA : Ágar Soja Triptona (CM131 - Oxoid) suplementado com 0,6% de extrato de levedura e antibióticos (eritromicina e cloranfenicol).

***média:** média aritmética das contagens obtidas para cada meio de cultura utilizado

Tabela 31. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de *L. monocytogenes* (10^3 a 10^4 UFC/cm²) enumeradas em quatro repetições genuínas do experimento em salsichas embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C.

Tempo (dias)	TRATADO			NÃO TRATADO		
	média	SD	CV	média	SD	CV
zero	3,1	0,5	15,8	3,6	0,5	13,4
7	3,7	0,7	20,3	3,6	0,2	4,8
14	3,6	0,5	13,7	3,6	0,2	4,6
21	3,5	0,5	13,2	3,5	0,4	11,8
28	3,2	0,0	1,3	3,3	0,5	14,5
35	2,9	0,5	15,9	3,2	0,3	10,9
42	2,5	0,4	14,3	3,2	0,2	7,2

Tabela 32. Média aritmética (média), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) das populações de *L. monocytogenes* (10^6 a 10^7 UFC/cm²) enumeradas em quatro repetições genuínas do experimento em salsichas embaladas a vácuo e armazenadas a 12°C.

Tempo (dias)	TRATADO			NÃO TRATADO		
	média	SD	CV	média	SD	CV
zero	6,6	0,2	2,4	6,7	0,2	3,0
7	6,8	0,3	4,2	6,8	0,2	3,6
14	6,6	0,4	5,4	6,6	0,3	3,9
21	6,8	0,3	4,8	6,7	0,3	5,0
28	6,2	0,6	9,3	6,3	0,6	9,3
35	6,4	0,3	4,5	6,3	0,7	11,5
42	6,1	0,3	5,4	6,1	0,6	10,4

Figura 12. Populações médias de *L. monocytogenes* artificialmente inoculadas (10^3 a 10^4 UFC/cm²) em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8 °C por 42 dias. (■ Não Tratado, ◆ Tratado)

Figura 13. Populações médias de *L. monocytogenes* artificialmente inoculadas (10^3 a 10^4 UFC/cm²) em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12 °C por 42 dias. (■ Não Tratado, ◆ Tratado)

Figura 14. Populações médias de *L. monocytogenes* artificialmente inoculadas (10^6 a 10^7 UFC/cm²) em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 8 °C por 42 dias. (■ Não Tratado, ◆ Tratado)

Figura 15. Populações médias de *L. monocytogenes* artificialmente inoculadas (10^6 a 10^7 UFC/cm²) em salsichas tratadas e não tratadas com nisina, embaladas a vácuo e armazenadas a 12 °C por 42 dias. (■ Não Tratado, ◆ Tratado).

5. DISCUSSÃO

von HOLY et al. (1991) quantificaram e caracterizaram a população microbiana associada à deterioração de salsichas Viena embaladas à vácuo. Ao analisarem 52 pacotes de salsichas deterioradas após 30 a 125 dias de estocagem e 10 de salsichas em boas condições para o consumo (com 4 a 10 dias de estocagem), os autores observaram a predominância de bactérias láticas em ambas as condições. No entanto, em 80% das amostras visivelmente deterioradas, as populações de microrganismos aeróbios e de bactérias láticas atingiram valores de 7 a 8 log UFC/g do produto, enquanto nas amostras normais, as populações microbianas analisadas variaram entre 3 a 4 log UFC/g do produto. Cinquenta e oito por cento das bactérias láticas caracterizadas eram lactobacilos homofermentativos e 36,3%, bactérias do gênero *Leuconostoc*.

Dependendo da temperatura de armazenamento e do nível de contaminação inicial, a microbiota deteriorante, particularmente as bactérias láticas, pode atingir $> 10^8$ UFC/g em um período relativamente curto (von HOLY e HOLZAPFEL, 1989 apud DAVIES et al., 1999).

Na presente pesquisa, tanto os produtos tratados com nisina como os não tratados possuíam populações de 7 a 8 log UFC/g após 1 a 2 semanas de armazenamento a 8°C. Esses níveis são compatíveis com produtos em deterioração e, provavelmente, decorrentes das altas populações de microrganismos inicialmente presentes no produto, refletindo deficiências de manipulação e higienização e sanitificação de equipamentos e utensílios.

Quando o produto foi submetido a condições de abuso de temperatura (12°C), a velocidade de multiplicação da microbiota deteriorante foi significativamente maior, atingindo populações ao redor de 8 log UFC/g já no terceiro dia de estocagem em ambos os grupos, tratado e não tratado, comprovando a grande influência da temperatura sobre a velocidade de multiplicação das bactérias em alimentos.

Quanto a eficiência da ação da nisina sobre a microbiota deteriorante naturalmente presente em salsichas, observou-se que o tratamento com 200 ppm de Nisaplin[®] em solução de ácido fosfórico grau alimentício não causa redução significativa da população de bactérias aeróbias mesófilas, psicrotróficas e bactérias lácticas, independentemente da temperatura de armazenamento utilizada.

Poucos estudos científicos foram desenvolvidos para avaliar o efeito inibitório da nisina sobre a microbiota deteriorante de produtos cárneos.

CUTTER e SIRAGUSA (1996) avaliaram o efeito da aspersão de uma solução de nisina contendo 5.000 UA/mL (Ambicin[®] - Applied Microbiology, NY) em água destilada sobre *Listeria innocua* e *Brochothrix thermosphacta* artificialmente inoculados em superfície de cortes bovinos embalados a vácuo e armazenados a 4°C. O tratamento proposto demonstrou-se eficaz para a inibição de ambos microrganismos, reduzindo a população de *L. innocua* em até 2,83 log UFC/ cm² e de *B. thermosphacta* a níveis não detectáveis

ARAIYAPITIPUN et al. (1999) determinaram a vida-de-prateleira de carne bovina fresca tratada com nisina e embalada à vácuo. Para tanto, utilizaram três soluções distintas contendo 200 UI/ml de nisina (Nisaplin[®]). Em uma delas, a nisina foi solubilizada em HCl 0,02N (pH 1,93), na segunda, em ácido láctico a 2% e na terceira solução, a mesma quantidade da bacteriocina foi solubilizada em ácido polilático de baixo peso molecular. As amostras foram imersas nas soluções durante 5 minutos e então embaladas à vácuo e armazenadas a 4°C. Foram enumeradas as populações de bactérias psicrotróficas, enterobactérias mesófilas e psicrotróficas, bactérias lácticas e *Pseudomonas* spp em intervalos regulares. Este estudo revelou que a nisina isoladamente, na concentração de 200 UI/mL, foi ineficiente para inibir a multiplicação dos microrganismos estudados. Observou-se apenas um efeito inibitório imediato sobre a população de bactérias aeróbias psicrotróficas. De acordo com os autores, esperava-se uma inibição significativa da população de *Lactobacillus* spp. nas amostras de carne tratadas com nisina já que o microrganismo é bastante semelhante ("closely related") ao *Lactococcus lactis*, microrganismo produtor da bacteriocina. Os autores sugerem que essa inibição pode não ter sido observada devido à baixa concentração de nisina utilizada.

Esses resultados são semelhantes aos encontrados na presente pesquisa, onde o efeito inibitório da nisina (redução de $< 1 \log \text{ UFC/cm}^2$) sobre a microbiota deteriorante foi apenas imediato; a partir do terceiro dia de estocagem, as populações desses microrganismos em salsichas tratadas e não tratadas já não diferiam estatisticamente entre si, e assim permaneceram durante todo o período de estocagem.

DAVIES et al.(1999) avaliaram a eficiência da utilização de nisina para o controle da deterioração por bactérias lácticas em mortadelas embaladas à vácuo e armazenadas a 8°C. Neste estudo, adicionou-se 25 mg/kg de nisina pura (equivalente a 1.000 mg/kg de uma preparação comercial com 2,5%) à emulsão carne destinada ao preparo das mortadelas e após a adequada homogeneização da massa, o produto foi pasteurizado a 72°C e estocado a 4°C por uma noite antes da inoculação das cepas de bactérias lácticas a serem testadas. Avaliou-se, ainda, a influência da porcentagem de gordura utilizada na emulsão e do tipo fosfato utilizado como emulsificante. Os autores concluíram que níveis de 25 mg/kg de nisina pura são suficientes para inibir a multiplicação de bactérias lácticas por até cinco semanas em mortadelas armazenadas a 8°C. Neste estudo, a nisina apresentou maior atividade inibitória contra as cepas testadas em mortadelas contendo 25% de gordura e difosfato como emulsificante.

KOSMINSKY et al. (1999) avaliaram a sensibilidade de microrganismos selecionados (*Brochothrix thermosphacta*, *Weissella viridescens*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Listeria monocytogenes*) a diferentes concentrações de nisina em salsichas comum e de frango. As salsichas foram tratadas por imersão em solução contendo diferentes concentrações de nisina (0, 25, 50 e 100 UI/mL da preparação comercial Chrisin[®] - Christian Hansen) em HCl 0,02N. A seguir, foram inoculadas por imersão em suspensão de células dos microrganismos a serem testados, embaladas à vácuo e armazenadas a 5°C por 12 dias. Os autores observaram que concentrações de 100 UI/mL foram suficientes para inibir a multiplicação dos microrganismos selecionados.

Assim, os estudos relacionados à atividade inibitória da nisina em produtos cárneos têm descritos resultados bastante variáveis, sugerindo, freqüentemente,

que altas concentrações de nisina são necessárias para atingir inibições significativas. A eficiência da nisina está também intimamente relacionada à natureza do sistema cárneo estudado e ao tipo de microrganismos que se deseja inibir (de VUYST e VANDAME, 1994; CALDERON et al., 1985; TAYLOR e SOMERS, 1985; RAYMAN et al., 1981)

Na presente pesquisa, diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, como a utilização de embalagem a vácuo e a estocagem a baixas temperaturas, favoreceram a multiplicação e predomínio de bactérias Gram positivas como microbiota deteriorante do produto, especialmente as bactérias lácticas, que são microrganismos sensíveis a ação antimicrobiana da nisina.

Esperava-se, portanto, que a redução da população de microrganismos deteriorantes presente fosse mais acentuada. Entretanto, a presença de uma carga microbiana inicial alta (4 a 5 log UFC/g) associada ao uso de baixas concentrações da bacteriocina podem ter resultado na baixa eficiência obtida pelo tratamento proposto.

A influência da composição do alimento sobre a atividade da substância também deve ser considerada já que diversos fatores limitam a eficiência da nisina em sistemas cárneos, como o teor de gordura, presença de emulsificantes, pH do alimento (DAVIES et al., 1999)

A eficiência da nisina como agente inibidor de *L. monocytogenes* já está bem documentada em estudos *in vitro* (UKUKU e SHELEF, 1997; HARRIS et al., 1991; BENKERROUM e SANDINE, 1988), assim como em produtos lácteos e termoprocessados (DELVES-BROUGHTON, 1990). Entretanto, os estudos realizados na tentativa de determinar o efeito inibitório do tratamento com nisina em sistemas cárneos são bastante contraditórios.

A presente pesquisa verificou que o tratamento com 200 ppm de Nisaplin[®] (200 UI/mL) resultou em diminuição estatisticamente significativa da população de *L. monocytogenes* em salsichas artificialmente contaminadas, quando o nível de contaminação inicial do alimento foi de 10^3 a 10^4 UFC/cm² e a temperatura de

armazenamento foi de 8°C. Entretanto, quando o produto foi estocado a 12°C, o tratamento com nisina não resultou em diminuição estatisticamente significativa das populações de *L. monocytogenes*, mesmo quando a carga microbiana inicialmente imposta ao produto foi menor (10^3 a 10^4 UFC/cm²). Isso demonstra que tanto a carga de contaminação inicial do alimento como sua temperatura de armazenamento interferem significativamente sobre o efeito inibitório da nisina sobre células de *L. monocytogenes*.

PAWAR et al. (2000) estudaram o efeito da aplicação da nisina (400 UI/ mL e 800 UI/ mL) associada ao cloreto de sódio (2%) sobre a sobrevivência de *L. monocytogenes* em carne moída de búfalo artificialmente contaminada (10^3 UFC/g) e estocada a 4°C por 16 dias. A adição de 400 UI/mL de nisina resultou em redução significativa da população de *L. monocytogenes* até o 10º dia de estocagem. Quando o tratamento foi realizado com 800 UI/mL, o efeito inibitório foi mais acentuado e perdurou até o final da estocagem. A adição de sal não influenciou de maneira significativa sobre a atividade da bacteriocina.

ZHANG e MUSTAPHA (1999) analisaram o efeito da aplicação de 5.000 UI/mL de nisina (0,5 g de Nisaplin[®] em 100 mL de HCl 0,02N, pH 2,0) e da combinação nisina-EDTA sobre *L. monocytogenes* Scott A e *Escherichia coli* O157:H7 em cubos de carne bovina fresca artificialmente contaminados e armazenados a 4°C por 30 dias. Houve uma redução imediata de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos na população de *L. monocytogenes* após o tratamento com nisina e com a combinação nisina-EDTA, mas já no segundo dia de armazenamento, observou-se um incremento de 1 log UFC/cm² e 1,51 log UFC/cm² nas tratadas com nisina e nisina-EDTA, respectivamente. Os autores sugerem que apesar do microrganismo ter se apresentado sensível à bacteriocina, a aplicação da nisina ocasionou apenas um efeito inibitório inicial, não havendo uma atuação contínua da substância sobre o microrganismo. Ainda, concluem que a aplicação de nisina ou nisina/EDTA associada à embalagem a vácuo e armazenamento a 4°C não é capaz de inibir *L. monocytogenes* Scott A em carne bovina por 30 dias de estocagem.

FANG e LIN (1994) estudaram a eficiência de diversas concentrações de nisina (1.000 UI/mL e 10.000 UI/mL) combinadas à utilização de atmosferas

contendo dióxido de carbono (CO₂) sobre o desenvolvimento de *L. monocytogenes* e *Pseudomonas fragi* (10² a 10³ UFC/g) em produto suíno cozido armazenado a 4 e 20°C. Os autores observaram que *L. monocytogenes* foi capaz de se multiplicar nas duas atmosferas modificadas propostas (100% CO₂ e 80% CO₂ + 20% O₂) na ausência de nisina. A adição de nisina propiciou a inibição do microrganismo nas atmosferas estudadas sendo que o efeito inibitório encontrado foi diretamente proporcional à quantidade de bacteriocina estudada e inversamente proporcional a temperatura de estocagem utilizada.

A ação da nisina como agente inibidor de microrganismos é dose-dependente, isto é, sua eficiência diminui proporcionalmente ao aumento do número de microrganismos alvo (RAYMAN et al., 1981). Isto é verdadeiro tanto para células vegetativas como para esporos.

Um estudo *in vitro* realizado por UKUKU e SHELEF (1997) avaliou os efeitos de duas concentrações de nisina (240 UI/ mL e 600 UI/mL) sobre diferentes populações (10³, 10⁴, 10⁶ e 10⁸ UFC/mL) de *L. monocytogenes* em pH 7,0 e 5,0. A utilização de 600 UI/mL ocasionou uma redução significativamente maior da população inicial trinta minutos após o tratamento quando comparado ao tratamento com baixas concentrações de nisina. Em uma população de aproximadamente 10⁸ UFC/ml, a aplicação de 600 UI/ml de nisina provocou uma redução de aproximadamente 7 ciclos logarítmicos, enquanto o tratamento com 240 UI/ml resultou em uma diminuição < 1 ciclo logarítmico.

No presente estudo, foi possível observar que o nível de contaminação por *L. monocytogenes* do alimento influenciou diretamente sobre a eficiência da bacteriocina. Quando o produto foi aplicado sobre salsichas artificialmente contaminadas em menores níveis (10³ a 10⁴ UFC/cm²), a redução média imediata da população de *L. monocytogenes* foi de 0,7 log UFC/cm² enquanto quando determinamos maiores níveis de contaminação superficial do produto (10⁶ a 10⁷ UFC/cm²), a redução média foi menor (0,3 log UFC/cm²), concordando com a afirmativa de RAYMAN et al. (1981). Assim, a pequena redução (< 1 ciclo logarítmico) da população de *L. monocytogenes* em salsichas tratadas com nisina observada na presente pesquisa pode ser explicada pela baixa concentração de

nisina (200 UI/mL) utilizada, resultando, portanto, em efeito menos pronunciado quando comparado aos resultados obtidos por outros autores.

As condições ambientais também influenciam sobre a atividade da nisina sobre os microrganismos. O tratamento pode resultar tanto em efeito bactericida como bacteriostático, de acordo com o estado energético da célula alvo. Quando o microrganismo é exposto a ótimas condições para seu desenvolvimento, as células se encontram em um estado mais energizado e o efeito ocasionado pela nisina é predominantemente bactericida (THOMAS et al., 2000). Isso se deve ao fato de que grande parte da energia utilizada para o processo de formação de poros pela bacteriocina ser fornecida pelo potencial transmembrana do próprio microrganismo. Assim, o efeito letal da nisina é máximo quando está atuando sobre células em multiplicação, cujas membranas estão completamente energizadas (THOMAS et al., 2000).

As condições propostas na presente pesquisa não resultaram em multiplicação significativa da população de *L. monocytogenes* artificialmente inoculada durante o armazenamento do produto por 42 dias, mesmo no produto não tratado. Isso sugere que a atuação da nisina pode ter sido predominantemente bacteriostática e transitória devido a sua aplicação sobre células pouco energizadas e ao rápido decréscimo da atividade da nisina em produtos cárneos.

Ao analisar o comportamento de *L. monocytogenes* em produtos cárneos cozidos fatiados, BEUMER et al. (1996) observaram que a bactéria é capaz de atingir níveis de até 10^8 UFC/g durante a vida-de-prateleira de diversos produtos cárneos estocados a 7°C. Entretanto, em outros estudos, *L. monocytogenes* foi incapaz de se multiplicar ou se multiplicou vagarosamente em presuntos artificialmente contaminados mantidos sob refrigeração (GRAU e VANDERLINE, 1992), similarmente ao observado neste estudo. Estas diferenças de comportamento podem ser atribuídas a diversos fatores, tais como composição dos produtos, baixas temperaturas de estocagem ou altos níveis de microbiota láctica deteriorante (McKELLAR et al., 1994). Esses fatores poderiam explicar também a ausência de multiplicação da bactéria na presente pesquisa, assim como o uso de solução de ácido fosfórico como veículo da nisina.

DELVES-BROUGHTON (1990) afirma que há perda da atividade da nisina durante o período de estocagem de um alimento, sendo mais pronunciada em altos valores de pH e altas temperaturas de estocagem. Segundo o autor, essa degradação já foi observada em queijo suíço processado, cogumelos enlatados, leite achocolatado e presunto cozido.

Em estudo realizado por CHUNG et al. (1989), os autores observaram um decréscimo de 95% da atividade da nisina em carne estocada a temperatura ambiente por 4 dias e uma perda de aproximadamente 70% da atividade da bacteriocina quando o alimento foi estocado a 5°C pelo mesmo período.

A perda rápida da atividade da nisina em produtos cárneos explica os resultados encontrados na presente pesquisa, bem como os resultados concordantes de outros autores anteriormente citados. A atuação da bacteriocina ocasiona a redução imediata das populações de *L. monocytogenes* porém o efeito inibitório é transitório devido a perda rápida e acentuada da atividade da substância.

Como já observado nos estudos realizados por FANG e LIN (1994) e CHUNG et al. (1989), temperaturas de armazenamento elevadas influenciam negativamente sobre a atividade inibitória da nisina, concordando com os resultados obtidos pelo presente estudo.

Estudos *in vitro* realizados por NILSSON et al. (1994) demonstraram que lipossomos derivados de células de *L. monocytogenes* mantidas a 4°C são mais sensíveis a nisina quando comparados aos derivados de células mantidas a 30°C. Isso, provavelmente, se deve ao aumento na proporção de cadeias de ácidos graxos insaturados na membrana lipídica a 4°C.

Diversos autores sugerem que a baixa eficiência da nisina em sistemas cárneos, seja ela diretamente adicionada ou produzida *in situ*, pode ser resultado de vários fatores, tais como, a ligação de moléculas de nisina a componentes da carne como proteínas e fosfolipídeos, produtos com composição heterogênea, homogeneização irregular, baixa adsorção à matriz cárnea, inativação da

bacteriocina por proteases ou outros ingredientes alimentares, pequena estabilidade térmica da molécula no pH da carne e alterações estruturais dos microrganismos em resposta a condições ambientais (GÄNZLE et al., 1999; de VUYST e VANDAME, 1994; DELVES-BROUGHTON, 1990).

O estado físico do alimento é uma variável importante a ser considerada. A nisina atua melhor em substratos líquidos homogêneos do que em substratos sólidos, que tendem a ser mais heterogêneos, provavelmente devido a melhor difusibilidade da substância (DELVES-BROUGHTON, 1996).

BLOM et al. (1998) desenvolveram um modelo para investigar a influência de fatores intrínsecos sobre a habilidade de difusão da nisina e observaram que fatores tais como pH, concentração de sal, nitrito e nitrato, proporção da fase aquosa disponível para difusão de substâncias, teor de gordura e a atividade proteolítica do substrato são potencialmente capazes de alterar a difusão da nisina e portanto, sua atividade antimicrobiana, de maneira sinérgica ou antagonística.

Cada matriz alimentar possui características próprias e peculiares; portanto, a eficácia da utilização de nisina como agente inibidor de microrganismos patogênicos e deteriorantes deve ser analisada para cada alimento individualmente, evitando extrapolações que podem ocasionar resultados pouco satisfatórios.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- a) O tratamento de salsichas com 200 ppm de Nisaplin[®] em solução de ácido fosfórico grau alimentício conforme preconizado pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (AUP nº 563/98) não é eficiente para causar redução significativa da população de microrganismos mesófilos, bactérias lácticas e microrganismos psicrotróficos no produto armazenado a 8°C ou a 12°C.
- b) O tratamento de salsichas com 200 ppm de Nisaplin[™] em solução de ácido fosfórico grau alimentício conforme preconizado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (AUP nº 563/98) não é eficiente para reduzir de maneira significativa as populações de *L. monocytogenes* no produto armazenado a 12°C, independente da carga microbiana inicialmente presente.
- c) O tratamento de salsichas com 200 ppm de Nisaplin[®] em solução de ácido fosfórico grau alimentício 0,1% tem efeito limitado na redução das populações de *Listeria monocytogenes* no produto armazenado a 8°C contendo 10^3 a 10^4 UFC/cm². Quando o nível de contaminação inicial do é mais elevado (10^6 a 10^7 UFC/cm²), esse efeito não pode ser observado.
- d) Embora tenha sido observado algum efeito inibitório do tratamento com nisina preconizado sobre as populações de *Listeria monocytogenes* em salsichas artificialmente contaminadas e armazenadas a 8°C, outras

medidas são necessárias para garantir a segurança microbiológica e/ou a extensão da vida útil do produto, tais como adoção de boas práticas de fabricação e efetivo controle dos pontos críticos de contaminação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, T., KROCKEL, L., HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.28, p.169-185, 1995.
- ARIYAPITIPUN, T., MUSTAPHA, A., CLARKE, A. C. Microbial Shelf Life Determination of Vacuum-Packaged Fresh Beef Treated with Polylactic Acid, Lactic Acid and Nisin Solutions. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.62, n.8, p.913-920, 1999.
- BENKERROUM, N., SANDINE, W.E. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.71, p.3237-3245, 1988.
- BERSOT, L.S., LANDGRAF, M., FRANCO, B.D.G.M., DESTRO, M.T. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.57, p.13-17, 2001.
- BEUMER, R.R., Te GIFFEL, M.C., DE BOER, E., ROMBOUTS, M. Growth of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked meat products. **Food Microbiol.**, London, v.13, p.333-340, 1996.
- BLOM, H., KATLA, T., HAGEN, B.F., AXELSSON, L. A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. **Int. J. Food. Microbiol.**, Amsterdam, v.15, p.103-109, 1997.
- BOWERS, C. Meat Scandal at Sara Lee. **CBS News**. Disponível em: <http://www.cbsnews.com/now/story/0.1597.308890-412.html> Acesso em: 30 ago 2001.

De acordo com a NBR6023/90 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas de periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1999 [CD-ROM].

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Autorização de Uso de Produto**. Ofício : AUP/DOI/DIPOA Nº563/98 em 19/11/98.

BREUKINK, E., van KRAAIJ, C., DEMEL, R.A., SIEZEN, R.J., KUIPERS, O.P., KRUIJFF, B. The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. **Biochemistry**, Columbus, v.36, p.6968-6976, 1997.

BRUNO, M.E.C., MONTVILLE, T.J. Common Mechanistic Action of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, n.9, p.3003-3010, 1993.

BÜLLA, C.J., BILLE, J., GLAUSER, M.P. An epidemic of food-borne listeriosis in Western Switzerland: description of 57 cases involving adults. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.20, p.66-72, 1995.

CALDERON, C., COLLINS-THOMPSON, D.L., USBORNE, W.R. Shelf-life studies of vacuum packaged bacon treated with nisin. **J. Food Prot.**, De Moines, v.48, p.330-333, 1985.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. Update: Multistate Outbreak of Listeriosis. Disponível em: <http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r990114.htm>. Acesso em: 17 mar. 1999.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. Preliminary Food Net Data on the Incidence of Foodborne illnesses – Selected Sites, United States, 2000. **MMWR**, Atlanta, v.50, n.13, 2001.

CHUNG, K.T., DICKSON, J.S., CROUSE, J.D. Effect of nisin on growth of bacteria attached to meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.55, p.1329-1333, 1989.

CUTTER, C.N., SIRAGUSA, G.R. Descontamination of beef carcass tissue with nisin using a pilot scale model carcass washer. **Food Microbiol.**, London, v.11, p.481-489, 1994.

- CUTTER, C.N., SIRAGUSA, G.N. Reductions of *L. innocua* and *Brochothrix thermosphacta* on beef following nisin spray treatments and vacuum packaging. **Food Microbiol.**, London, v.13, p.23-33, 1996.
- DAVIES, E.A., MILNE, C.F., BEVIS, H.E., POTTER, R.W., HARRIS, J.M., WILLIAMS, G.C., THOMAS, L.V., DELVES-BROUGHTON, J. Effective Use of Nisin to Control Lactic Acid Bacterial Spoilage in Vacuum-Packed Bologna-type Sausage. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.62, n.9, p.1004-1010, 1999.
- DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and Its Uses as a Food Preservative. **Food Technol.**, Chicago, v.44, n.11, p.100-117, 1990.
- DESTRO, M.T., SERRANO, A.M., KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, Guilford, v.2, n.2, p.110-112, 1991.
- DeVOS, W.M., KUIPERS, O.P., VAN DER MEER, J.R., SIEZEN, R.J. Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram positive bacteria. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.17, p.427-437, 1995.
- DeVOS, W.M., MULDER, J.W.M., HUGENHOLTZ, J., SIEZEN, R.J., KUIPERS, O.P. Properties of nisin Z and the distribution of its gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, p.213-218, 1993.
- De VUYST, L., VANDAMME, E.J. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: HOOVER, D.G.; STEENSON, L.R., eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Glasgow: Chapman & Hall, , p.151-221, 1994.
- DOYLE, M.P. Effects of environmental and processing condition on *Listeria monocytogenes*. **Food Technol.**, Chicago, v. 42, n.4, p.169-171, 1988.

- DUGGAN, J., PHILLIPS, C.A. *Listeria* in the domestic environment. **Nutr. Food Sci.**, Yorkshire, v.213, n.2, p.73-79, 1998.
- DYKES, G.A., CLOETE, T.E., von HOLY, A. Quantification of microbial populations associated with the manufacture of vacuum-packaged, smoked Vienna sausage. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.13, p.239-248, 1991.
- FANG, T., LIN, L. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on cooked pork in a modified atmosphere packaging/nisin combination system. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.57, n.6, p.479-485, 1994.
- FARBER, J.M., PETERKIN, P.I. Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in Meat Products. In: RYSER, E.T. & MARTH, E.H eds. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2nd Edition, revised and expanded. New York: Marcell Dekker Inc., p.505-564, 1999.
- FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADITIVES. Specifications for identity and purity of some antibiotics. 12th Report. **WHO Technical Rep. Ser.**, n. 430, 1969.
- FENLON, D.R. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. **J. Appl. Bacteriol.**, London, v.59, n.6, p.537-543, 1985.
- FOEGEDING, P.M., THOMAS, A.B., PILKINGTON, D.H., KLAENHAMMER, T.R. Enhanced control of *L. monocytogenes* in situ produced pediocin during fermented sausage production. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.58, p.884-890, 1992.
- FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. Interpretive Summary: Draft Assessment of the Relative Risk to Public Health From Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. Disponível em: <http://www.foodsafety.gov/%7Edms/lmrisk.htm>. Acesso em: 15 set 2001.

- GÄNZLE, M.G., WEBER, S., HAMMES, W.P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **Int. J. Food Microbiology**, Amsterdam, v.46, p.207-217, 1999.
- GELLIN, B.G, BROOME, C.V. Listeriosis. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.261, p.1313-1320, 1989.
- GILL. C.O., REICHEL, M.P. Growth of the cold-tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on high-pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. **Food Microbiol.**, London, v.6, p. 223-230, 1989.
- GLASS, K.A., DOYLE, M.P. Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. **Appl. Environ. Microb.**, Washington, v.55, n.6, p.1565-1569, 1989.
- GRAU, F.H., VANDERLINE, P.B. Occurrence, numbers and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.55, p.4-7, 1992.
- GRAVANI, R. Incidence and Control of *Listeria* in Food-Processing Facilities. In: RYSER, E.T., MARTH, E.H eds. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2nd Edition, revised and expanded. New York: Marcell Dekker Inc., p.657-709, 1999.
- GROSS, E., MORELL, J.L. The structure of nisin. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.93, p.4634-4635, 1971.
- HARA, S., YAKAZU, K., NAKAKAWAJI, K., KOBAYASHI, T., SATA,M., IMAI, Z., SHIBUYA, T. An investigation of toxicity of nisin with particular reference to experimental studies of its oral administration and influences on digestive enzymes. **Tokyo Med. Univ. J.**, Tokyo, v.20, p.175-207, 1962. Apud: THOMAS, L.V., CLARKSON, M.R., DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. In: NAID, A.S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. Boca Raton: CRC Press, 2000. 818p

HARRIS, L.J., FLEMING,, P.H., KLAENHAMMER. Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A e UAL500 to nisin. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.54, p.836-840, 1991.

HELANDER, I.M., von WRIGHT, A., MATTILA-SANDHOLM, T.M. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. **Trends Food Sci. Technol.**, Oxford,v.8, p.146-150, 1997.

HURST, A. Nisin. **Adv. Appl. Microbiol.**, San Diego, v.27, p.85-123, 1981.

INTERNATIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. *Listeria monocytogenes*. In: _____. **Microorganisms in Foods 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens**. London: Chapman & Hall, 1996. cap.8, p.141-183.

JAY, J.M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**, Guilford, v.7, n.4/5, p.209-214, 1996.

JENSEN, A., FREDERIKSEN, W., GERNER-SMIDT, P. Risk factors for listeriosis in Denmark. **Scand. J. Infect. Dis.**, Oslo, v.26, p.171-178, 1994.

JOHNSON, J.L., DOYLE, M.P., CASSENS, R.G. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products - A review. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.53, n.1, p.81-91, 1990.

JUNG, G. Lantibiotics – ribossomally synthesised biologically active polypeptides containing sulfide bridges and α,β -didehydroaminoacids. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v.30, p.1051-1068, 1991

KAYA, M., SCHMIDT, U. Verhalten von *Listeria monocytogenes* in Hackfleisch bei Kuehl-und Gefrierlagerung. **Fleischwirtschaft.**, Frankfurt, v.69, n.4, p.617-620, 1989. apud: INTERNATIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. *Listeria monocytogenes*. In: _____. **Microorganisms in Foods 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens**. London: Chapman & Hall, 1996. cap.8, p.141-183.

- KLAENHAMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol.**, Amsterdam, v.12, p.39-86, 1993.
- KOSMINSKY, G.R., LUCHESE, R.H., MARTINS, J.F. Avaliação da sensibilidade de microrganismos selecionados a diferentes concentrações de nisina em salsichas comum e de frango. **Hig. Alimentar**, São Paulo, v.13, n.63, p.56-63, 1999.
- LABUZA, T.P. Shelf life dating of foods. Westport: **Food Nutr.**, India, 1982, p.1.
- LIU, W., HANSEN, J.N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.56, n.8, p.2551-2558, 1990.
- MAFU, A. A., ROY, D., GOULET, J., MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.53, n. , p.742-746, 1990.
- MARINKOVIC, D., NIKOLIC, R., BOZOVIC, V., POZNANIC, S., MARJANOVIC, M. Keeping characteristics of frankfurter-type sausage in Belgrade wholesale and retail storage facilities. **Tehnologija-Mesa**, v.24, n.5, p.143-146, 1983. apud: NAKASHIMA, S.M.K. **Aplicação da microbiologia preditiva para modelar o crescimento de bactérias deteriorantes em salsichas**. São Paulo, 2001. 128p (Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- MATURIN, L. J.; PEELER, J.T. Aerobic Plate Count. In: Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual**. Gaithersburg: AOAC, 1995, cap.3, p.3.01-3.09.
- McCLURE, P.J., KELLY, T.M., ROBERTS, T.A. The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food. Microbiol.**, Amsterdam, v.14, p.77-92, 1991.

- McKELLAR, R.C., MOIR, R., KALAB, M. Factors influencing the survival and growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of Canadian retail wieners. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.57, n.5, p.387-392, 1994.
- MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., McCAIG, L.F., BRESEE, J.S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P.M., TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v.5, n.5, p.607-625, 1999.
- MONTVILLE, T.J., CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.50, p.511-519, 1998.
- MONTVILLE, T.J., WINKOWSKI, K., LUDESCHER, R.D. Models and Mechanisms for Bacteriocins Action and Application. **Int. Dairy Journal**, v.5, p.797-814, 1995.
- MORENO, I., VIALTA, A., LERAYER, A.L.S., LEITÃO, M.F.F. Nisina no controle de bactérias esporogênicas em produtos lácteos. **Bol. SBCTA**, Campinas, v.33, n.2, p.215-228, 1999.
- MULDERS, J.W.M., BOERRIGTER, I.J., ROLLEMA, H.S., SIEZEN, R.J., De VOS, W.M. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v. 201, p.581-584, 1991.
- NAKASHIMA, S.M.K. **Aplicação da microbiologia preditiva para modelar o crescimento de bactérias deteriorantes em salsichas**. São Paulo, 2001. 128p (Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- NATIONAL HOT DOG & SAUSAGE COUNCIL. Vital Hot Dog Statistics. Disponível em: http://www.hot-dog.org/hd_vitalstats.htm. Acesso em: 14 nov 2001.
- NETTER, J., KUTNER, M.H., NACHTSHEIM, C.J., WASSERMAN, W. **Applied Linear Statistical Models**. Boston: Mc Graw Hill, 1996, 1408p.

- NICHOLLS, D.G., FERGUNSON, S.J. Chemiosmotic energy transduction. In: _____. **Bioenergetics**. London: Academic Press, 1992, p.1-20.
- NILSSON, L., CHEN, Y., CHIKINDAS, M., HUSS, H.H., GRAM, L., MONTVILLE, T.J. Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.66, n.2, p.769-774, 2000.
- NYFELDT, A. Etiologie de la mononucleose infectieuse. **Soc. Biol.**, v.101, p.590-592, 1929. apud: SLUTSKER, L. & SCHUCHAT, A. Listeriosis in Humans. In : RYSER, E.T. & MARTH, E.H. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2nd ed, revised and expanded. New York: Marcell Dekker Inc., 1999, cap.3, p. 75-95.
- OLSEN, J.A., YOUSEF, A.E., MARTH, E.H. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* during making and storage of butter. **Milchwissenschaft**. V.43, n.8, p.487-489, 1988. apud: THE INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. *Listeria monocytogenes*. In: _____. **Microorganisms in Foods 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens**. London: Chapman & Hall, p.141-183, 1996.
- PAWAR, D.D., MALIK, S.V.S., BHILEGAONKAR, K.N., BARBUDDHE, S.B. Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.56, p.215-219, 2000.
- RAYMAN, K., ARIS, B., HURST, A. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.42, p.375-380, 1981.
- REVISTA NACIONAL DA CARNE. Setor de tripas impulsionado pelo aumento de consumo de embutidos , **Rev. Nac. Carne** , São Paulo, n.289, p.58, 60, 63, 64, 2001.
- ROBERTS, T. & PINNER, R. Economic Impact of disease caused by *Listeria monocytogenes*. In : MILLER, A.J., SMITH, J.L., SOMKUTI, G.A. **Foodborne**

- Listeriosis**. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Company Inc., 1990, cap.22, p.137-148.
- ROCOURT, J. Risks factors for listeriosis. **Food Control**, Guilford, v.7, n.4/5, p.195-202, 1996.
- ROSA, C. M. **Caracterização e purificação de uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a isolado de lingüiça frescal**. São Paulo, 2001. 98p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).
- SARANTÓPOULOS, C.I.G.L., PASSOS, R.B., DESTRO, M.T., SHIROSE, I. Estudo da estabilidade de salsichas embalada a vácuo e pasteurizada. **Colet. ITAL**, Campinas, v.20, n.2, p.184-193, 1990.
- SCHLECH, W.F. Overview of listeriosis. **Food Control**, Guilford, v.7, n.4/5, p.183-186, 1996.
- SCHLECH, W.F., LAVIGNE, R.A., BORTOLUSSI, A.C., ALLEN, E.V., HALDANE, A.J., WORT, A.J., HIGHTOWER, A.W., JOHNSON, S.E., KING, S.H., NICHOLLS, E.S., BROOME, C.V. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.308, p.203-206, 1983.
- SCHLEIFER, K.H., KRAUS, J., BVORAK, C., KILPPER-BÄLZ, R., COLLINS, M.D., FISCHER, W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. Nov. **Syst. Appl. Microbiol.**, Jena, v.6, p.183-195, 1985.
- SCHWARTZ, B., BROOME, C.V., BROWN, G.R., HIGHTOWER, A.W., CIESIELSKI, C.A., GAVENTA, S., GELLIN, B.G., MASCOLA, L. Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. **Lancet**, London, v. 1, p.779-782, 1988.

- SKOVGAARD, N., NORRUNG, B. The incidence of *Listeria* spp in faeces of danish pigs and in minced pork meat. **Int. J. of Food Microbiol.**, Amsterdam, v.8, p.59-63, 1989.
- SLADE, P. J. Monitoring *Listeria* in the food production environment.1. Detection of *Listeria* in processing plants and isolation methodology – review paper. **Food Res. Int.**, Oxford, v.25, p.45-56, 1992.
- SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in Humans. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H., eds. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2nd Edition. New York: Marcell Dekker Inc., 1999, cap.3, p. 75-95.
- SWAMINATHAN, B. **Listeria monocytogenes**. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers**. 2nd Edition. Washington: ASM Press, 2001, cap.18, p. 383-409.
- TAYLOR, S.L., SOMERS, E.B. Evaluation of the antibotulinal effectiveness of nisin in bacon. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.48, n.11, p.949-952, 1985.
- THOMAS, L.V., CLARKSON, M.R., DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. In: NAID, A.S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. Boca Raton: CRC Press, 2000, cap.18, p. 463-824.
- TRAMER, J. The inhibitory action of nisin on *Bacillus stearothermophilus*. In: MOLIN, N, ed. **Microbial Inhibitions in Foods**. Stockolm: Almqvist and Wiksell, p.25, 1964 apud: DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and Its Uses as a Food Preservative. **Food Technol.**, Chicago, v.44, n.11, p.100-117, 1990.
- UKUKU, D.O., SHELEF, L.A. Sensitivity of six straisn of *Listeria monocytogenes* to nisin. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.60, n.7, p.867-869,1997.
- VEDAMUTHU, E.R.; RACCACH, M.; GLATZ, B.A.; E.W. SEITZ; REDDY, M.S. Acid-Producing Microorganisms. **Compedium of Methods for the Microbiological**

Examination of Foods. Washington: American Public Health Association. APHA, 1992, cap.15, p.225-236.

Von HOLY, A., HOLZAPFEL, W.H., DYKES, G.A. Bacterial populations associated with Vienna sausage packaging. **Food Microbiol.**, London, v.9, p.45-53, 1992.

Von HOLY, A., HOLZAPFEL, W.H. Spoilage of vacuum packaged processed meats by lactic acid bacteria, and economic consequences. In: **Proceedings of the 10th International WAVFH Symposium**, Stockholm, p.185-190, 1989. Apud: DAVIES, E.A., MILNE, C.F., BEVIS, H.E., POTTER, R.W., HARRIS, J.M., WILLIAMS, G.C., THOMAS, L.V., DELVES-BROUGHTON, J. Effective Use of Nisin to Control Lactic Acid Bacterial Spoilage in Vacuum-Packed Bologna-type Sausage. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.62, n.9, p.1004-1010, 1999.

Von HOLY, A., CLOETE, T.E., HOLZAPFEL, W.H. Quantification and characterization of microbial populations associated with spoiled, vacuum-packed Vienna sausages. **Food Microbiol.**, London, v.8, p.95-104, 1991.

WANG, C. & MURIANA, P.M. Incidence of *Listeria monocytogenes* in packages of retail franks. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.57, n.5, p.382-386, 1994.

WENGER, J.D., SWAMINATHAN, B., HAYES, P.S., GREEN, S.S., PRATT, M., PINNER, R.W., SCHUCHAT, A., BROOME, C.V. *Listeria monocytogenes* contamination of turkey franks: evaluation of a production facility. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.53, n.12, p.1015-1019, 1990.

ZAICA, L. L., PALUMBO, S.A., SMITH, J.L., DEL CORRAL, F., BHADURI, S., JONES, C.O., KIM, A. H. Destruction of *Listeria monocytogenes* during frankfurter processing. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.53, n.1, p.18-21, 1990.

ZHANG, S., MUSTAPHA, A. Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 numbers on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin or combined with EDTA. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.62, n.10, p.1123-1127, 1999.

Anexo 1. Autorização de uso de produto AUP nº 563/98

Prazo de validade: 30.11.2004

Nome do produto: Nisaplin®

Marca/Fabricante: Aplin & Barret Ltda.

Finalidade e Modo de Uso: empregar na superfície externa de produtos cárneos, mais especificamente nas salsichas dos diferentes tipos. Aplicar o produto em solução de 200 ppm (0,02%) de Nisaplin em solução de ácido fosfórico grau alimentício

Anexo 2. Análise de variância para os efeitos das interações e fatores estudados para as populações de microrganismos aeróbios mesófilos, bactérias láticas e microrganismos psicrotróficos.

Fontes de Variação		Níveis Descritivos (p)		
		Microrganismos Mesófilos	Bactérias Láticas	Microrganismos Psicrotróficos
Fatores	Temperatura (8°C e 12°C)	0,000	0,000	0,064
	Grupo (tratado e não tratado)	0,442	0,576	0,593
	Dia (0,3,7,14,21,28,35,42)	0,000	0,000	0,000
Interações	Temperatura*Grupo	0,222	0,428	0,581
	Temperatura*Dia	0,000	0,000	0,000
	Grupo*Dia	0,867	0,847	0,267
	Temperatura*Grupo*Dia	1,000	0,992	0,860

Valores em negrito: $p < 0,05$ (diferença estatisticamente significativa)

Anexo 3. Análise de variância para os efeitos das interações e fatores estudados para as populações de *L. monocytogenes* (log UFC/cm²) em salsichas artificialmente contaminadas.

Fonte de variação	Nível descritivo (p)	Fonte de variação	Nível descritivo (p)
Dia (0,7,14,21,28,35,42)	0.000	Dia*grupo	0.419
Grupo(tratado e não tratado)	0.000	Dia*inóculo	0.780
Temperatura (8 e 12°C)	0.001	Temperatura*inóculo	0.457
Inóculo (baixo e alto)	0.000	Dia*grupo*temperatura	0.735
Dia*temperatura	0.007	Dia*grupo*inóculo	0.665
Grupo*temperatura	0.046	Dia*temp*inóculo	0.732
Grupo*inóculo	0.001	Grupo*temp*inóculo	0.753

Valores em negrito: $p < 0,05$ (diferença estatisticamente significativa)