

## Área: Tecnologia de Alimentos

# EFEITO DA NISINA COMO CONSERVANTE NATURAL EM PRESUNTO COZIDO FATIADO EMBALADO A VÁCUO

Daneysa Lahis Kalschne\*, Simone Geitenes, Celonice Mendes Pereira Sarmiento, Eliane Colla

PPGTA – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos,  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná.

\*E-mail: daneysa@hotmail.com

**RESUMO** – O presente trabalho teve como objetivo o acompanhamento do crescimento de microrganismos deteriorantes do grupo das bactérias lácticas (BAL) em quatro formulações de presunto cozido fatiado embalado à vácuo, três contendo nisina como conservante natural (F1, F2 e F3) e uma Controle (sem nisina). A partir dos resultados obtidos para a enumeração de BAL durante a vida de prateleira (60 dias a 8 °C) realizou-se a predição do crescimento desses microrganismos por meio do ajuste ao modelo Logístico para a obtenção dos parâmetros de crescimento população máxima atingida ( $A$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu$ ) e duração da fase *lag* ( $\lambda$ ). Os resultados indicaram que a nisina foi efetiva para reduzir o crescimento microbiano em 2 a 3 ciclos logarítmicos, nas três concentrações aplicadas (0,013%, 0,007% e 0,001%), em comparação à formulação Controle. Adicionalmente, os índices estatísticos ( $MSE$  - erro médio quadrático, Fator *Bias*, Fator de exatidão e  $R^2$ ) mostraram ajustes adequados, indicando que os dados preditos se aproximaram dos observados.

**Palavras-chave:** deterioração, Gram-positivos, microbiologia preditiva, modelo Logístico, índices estatísticos.

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos vem superando novos desafios relacionados a questões de qualidade, dentre os quais qualidade nutricional, físico-química, microbiológica e sensorial investindo em ingredientes e processos inovadores. Relacionado à qualidade microbiológica, as bacteriocinas vem ganhando destaque em pesquisas que visam a inibição de certos grupos de microrganismos. Definidas como peptídeos microbianos pequenos, estáveis e com mecanismos de inibição microbiana com imunidade específica para o organismo produtor (COTTER, HILL & ROSS, 2005), são classificadas como conservantes naturais em alimentos.

A nisina é a bacteriocina mais pesquisada até então, sendo produzida pelo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* mostrando atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas, incluindo esporos bacterianos, entretanto é inativa frente a bactérias Gram-negativas, fungos e leveduras (ECONOMOU et al., 2009). A nisina é

essencialmente não tóxica, não levando a resistência cruzada com medicamentos, sendo degradada sem danos no trato intestinal (LINDSAY, 2010).

Aliado ao desenvolvimento microbiano, ferramentas como a microbiologia preditiva tem sido utilizadas para prever o crescimento de microrganismos nos alimentos (ERKMEN & BARAZY, 2008).

A seleção e identificação dos microrganismos de interesse é a primeira etapa para solucionar problemas relacionados à microbiota do alimento. Os produtos cárneos são altamente perecíveis, sendo que a redução do oxigênio nas embalagens com barreiras prolongam a vida de prateleira da carne, reduzindo a oxidação lipídica e o crescimento microbiano (AUDENAERT et al., 2010). Entretanto a combinação de condições microaerófilas, presença de NaCl, NaNO<sub>2</sub> e a redução da atividade de água inibem o crescimento da microbiota Gram-negativa, mas acaba favorecendo a microbiota Gram-positiva (HU et al., 2009; AUDENAERT et al., 2010). Nesse grupo de produtos as bactérias lácticas (BAL) tem seu crescimento favorecido, sendo descritas como principal deteriorante por diversos pesquisadores (HU et al., 2009; SLONGO et al., 2009; HAN et al., 2011).

Em função destas considerações, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito inibitório da nisina em presunto cozido fatiado embalado à vácuo, frente ao crescimento de BAL durante o armazenamento sob refrigeração, e realizar a predição dos parâmetros de crescimento.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram elaboradas quatro formulações de presunto, três com adição de nisina e uma Controle. As amostras foram preparadas a partir da injeção do pernil suíno conforme a salmoura indicada na Tabela 1, seguida de tampleamento por 2 h e cura por 8 h. As amostras foram embutidas em tripas *cook-in* e submetidas ao processo de cozimento em água a 85 °C até atingir a temperatura de 72 °C no centro geométrico do produto. Foram resfriadas até a temperatura de 0°C, removidas da tripa, fatiadas na espessura de 1,6 ± 0,2 mm em fatiadeira automática, embaladas 10 fatias por embalagem selada a vácuo (≈ 200 g/embalagem).

Tabela 1 – Formulações de presunto cozido fatiado embalado à vácuo com nisina (F1, F2 e F3) e Controle.

Matéria-prima e ingredientes (%)	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	Controle
Pernil suíno	74,628	74,633	74,639	74,640
Cloreto de sódio	1,000	1,000	1,000	1,000
Lactato de sódio	1,000	1,000	1,000	1,000
Eritorbato de sódio	0,050	0,050	0,050	0,050
Tripolifosfato de sódio	0,300	0,300	0,300	0,300
Nisina	0,0130	0,0070	0,0010	0,0000
Água	18,000	18,000	18,000	18,000
Proteína isolada de soja	2,000	2,000	2,000	2,000
Sal de cura*	0,200	0,200	0,200	0,200
Xarope de glucose	1,500	1,500	1,500	1,500
Condimento	0,800	0,800	0,800	0,800
Carmim de cochonilha	0,010	0,010	0,010	0,010
Carragena	0,500	0,500	0,500	0,500
Total	100,000	100,000	100,000	100,000

\* Composição: 2,0% nitrato; 5,5% nitrito; e 92,5% cloreto de sódio.

As amostras foram armazenadas a 8 °C durante 60 dias e analisadas para a contagem de BAL pelo plaqueamento em profundidade em ágar Man Rogosa e Sharpe (Himedia, Mumbai, Índia), sendo as placas incubadas invertidas em atmosfera normal a 30 °C por 48 h (RUSSO et al. 2006; SILVA et al., 2010). Os dados experimentais das contagens em placas foram ajustados ao modelo Logístico dado pelas equações 1, 2 e 3.

$$y = \frac{A}{(1 + \exp(D - P.t))} \quad (1)$$

$$\mu = C.P/4 \quad (2)$$

$$\lambda = D - 2/P \quad (3)$$

Onde:  $y = \log N/N_0$ ;  $A$  = população máxima atingida ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ );  $C, D, P$  = parâmetros do modelo;  $t$  = tempo (dias)  $\mu$  = velocidade específica máxima de crescimento ( $\text{dias}^{-1}$ );  $\lambda$  = duração da fase *lag* (dias).

O *software* STATISTICA 8.0 (Statsoft, Oklahoma, USA) foi utilizado para a obtenção das curvas de crescimento geradas pelo modelo preditivo. A adequacidade do modelo preditivo foi analisada pelos índices estatísticos: erro médio quadrático (*MSE* - *mean square error*) (Equação 4), Fator *Bias* (Equação 5), Fator de exatidão (Equação 6) (ROSS, 1996) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) (Equação 7) (RODRIGUES & IEMMA, 2010).

$$MSE = \frac{\sum (VO - VP)^2}{n} \quad (4)$$

$$\text{Fator Bias} = 10^{\left( \frac{\sum \log(VO/VP)}{n} \right)} \quad (5)$$

$$\text{Fator de exatidão} = 10^{\left( \frac{\sum |\log(VO/VP)|}{n} \right)} \quad (6)$$

$$R^2 = \frac{SQRL}{SQT_c} \quad (7)$$

Onde:  $VO$  = valor observado;  $VP$  = valor predito;  $n$  = graus de liberdade;  $SQRL$  = soma quadrática da regressão linear;  $SQT_c$  = soma quadrática total corrigida.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formulação Controle mostrou um aumento rápido na contagem de BAL, enquanto as formulações F1, F2 e F3 apresentaram contagens de 2 a 3 ciclos *log* inferiores, motivo pelo qual F1, F2 e F3 mostraram população máxima atingida ( $A$ ) e velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu$ ) inferiores, e uma fase *lag* ( $\lambda$ ) mais extensa quando comparadas com a formulação Controle, conforme indicado na Tabela 2.

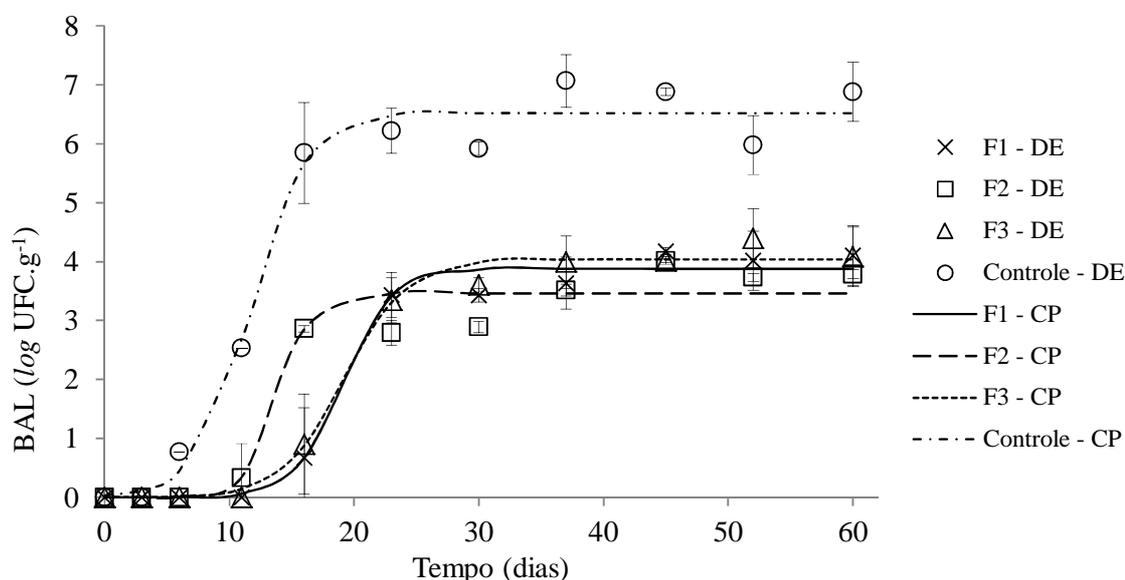
Tabela 2 – Parâmetros de crescimento preditos pelo ajuste dos dados experimentais das formulações F1, F2, F3 e Controle ao modelo Logístico.

Formulação	A ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ )	$\mu$ ( $\text{dias}^{-1}$ )	$\lambda$ (dias)
F1	3,877	0,492	15,155
F2	3,459	0,646	11,269
F3	4,037	0,402	14,203
Controle	6,518	0,729	7,320

As curvas de crescimento das BAL para as quatro formulações estudadas estão apresentadas na Figura 1. A adição de nisina influenciou significativamente na redução do crescimento das BAL, independente da concentração aplicada (0,013%, 0,007% e 0,001% para F1, F2 e F3, respectivamente).

Contagens de  $7 \log$  de  $\text{UFC.g}^{-1}$  são consideradas o limite máximo para a deterioração de alimentos por microrganismos como as BAL (KREYENSCHMIDT et al., 2009). As três formulações contendo nisina atingiram valores de 2 a 3  $\log$  inferiores a  $7 \log \text{UFC.g}^{-1}$  para os dados experimentais, bem como para a curva de crescimento predita. A formulação Controle apresentou duas contagens ligeiramente acima de  $7 \log$  de  $\text{UFC.g}^{-1}$ , entretanto a curva de crescimento predita indicou uma população máxima (A) de  $6,518 \log \text{UFC.g}^{-1}$ , o que indica conformidade com o valor previamente reportado por Kreyenschmidt et al. (2006), entretanto quando comparada as formulações F1, F2 e F3, a formulação Controle apresentou contagens superiores, que indicam uma deterioração mais acentuada.

Figura 1 – Modelagem matemática do crescimento das BAL em amostras de presunto cozido fatiado embalado á vácuo (F1, F2, F3 e Controle). DE: dados experimentais; CP: curva predita pelo modelo Logístico.



O ajuste do modelo Logístico aos dados experimentais foi considerado adequado, tendo em vista os valores calculados a partir dos índices estatísticos apresentados na Tabela 3.

O MSE fornece um indicativo do erro que leva em conta a soma dos quadrados dos resíduos e os graus de liberdade. A proximidade de seus valores de zero indica um melhor ajuste do modelo, assim as formulações que mais se distanciaram do zero foram a F2 e a Controle, sendo que essas ainda mostraram um bom ajuste.

Tabela 3 – Índices estatísticos (*MSE*, Fator *Bias*, Fator de exatidão e  $R^2$ ) calculados para avaliar o ajuste dos dados experimentais de crescimento das BAL aos valores preditos pelo modelo Logístico.

Formulação	<i>MSE</i>	Fator <i>Bias</i>	Fator de exatidão	$R^2$
F1	0,051	0,998	1,046	0,995
F2	0,157	0,989	1,100	0,978
F3	0,037	1,002	1,032	0,996
Controle	0,182	1,061	1,138	0,991

O Fator *Bias* é uma estimativa da diferença entre os valores preditos e observados, é na verdade um desvio relativo médio, pois procura dar o mesmo peso na média dos valores que sobre-estimam e subestimam a média. No entanto quando o Fator *Bias* é maior que 1, significa que o modelo falha na zona de perigo e o valor predito é maior que o observado; enquanto que quando o Fator *Bias* é menor que 1, significa que o modelo falha na zona segura, ou seja o valor predito é menor que o observado. Para as formulações F1 e F2 o Fator *Bias* foi inferior a 1, e para F3 e Controle, foi superior a 1, mas para todas elas se aproximou do valor ideal (1).

O Fator de exatidão é uma medida utilizada para obter a diferença média absoluta entre os valores preditos e observados. Conforme o Fator de exatidão aumenta, o modelo é menos exato na média, logo como se calcula uma média dos valores, os valores com sinais positivos e negativos tendem a se anular. O cálculo do Fator de exatidão, por se tratar de valores absolutos, será sempre maior que 1, assim quanto maior o seu valor, menor a exatidão da estimativa da média. As formulações F2 e Controle apresentaram as maiores diferenças em relação ao valor ótimo para o Fator de exatidão, mas mesmo assim apresentaram bons ajustes.

O  $R^2$  é uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas (RODRIGUES & IEMMA, 2009). Quanto mais próximo de 1, melhor é considerado o valor do  $R^2$ ; isso indica que os valores obtidos se aproximam muito dos preditos, pois todos foram próximos de 1.

## 4 CONCLUSÃO

A nisina mostrou-se um eficiente conservante natural na redução do crescimento de BAL em presunto cozido fatiado embalado a vácuo, sendo que as três formulações avaliadas (0,013%, 0,007% e 0,001% de nisina) foram eficientes, indicando que baixas concentrações (como 0,001%) são suficiente para retardar o crescimento microbiano láctico. A microbiologia preditiva mostrou-se uma ferramenta útil na predição dos parâmetros de crescimento e curvas de crescimento. O modelo Logístico mostrou um bom ajuste para as curvas de crescimento em relação aos dados experimentais quando avaliado pelos índices estatísticos, podendo ser utilizado para a predição do crescimento das BAL nas formulações estudadas.

## 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPQ pelo fornecimento de uma bolsa de estudos de iniciação científica para o segundo autor.

## 6 REFERÊNCIAS

- AUDENAERT, K.; D'HAENE, K.; MESSENS, K.; RUYSSSEN, T.; VANDAMME, P.; HUYS, G. Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 27, p. 12-18, 2010.
- AXELSSON, L. (2004). **Acid lactic bacteria: classification and physiology**. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A.V.; OUWEHAND, A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. New York: Marcel Dekker Inc, 2004, 1-66 p.
- COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews**, v. 3, p. 777-788, 2005.
- ECONOMOU, T.; POURNIS, N.; NTZIMANI, A.; SAVVAIDIS, I.N. Nisin-EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1470-1476, 2009.
- ERKMEN, O., BARAZI, A. Modelling the effects of modified atmosphere on *Salmonella typhimurium* in packaged meat during storage in the refrigerator and at 12 °C. **Annals of Microbiology**, v. 1, p. 73-81, 2008.
- HALL, P.A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R.S. **Acid-producing Microorganisms**. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington: American Public Health Association, 2001, 201-207p.
- HAN, Y.; JIANG, Y.; XU, X.; SUN, X.; XU, B.; ZHOU, G. Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham. **Meat Science**, v. 88, p. 682-688, 2011.
- HU, P.; ZHOU, G.; XU, X.; LI, C.; HAN, Y. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE. **Food Control**, v. 20, p. 99-104, 2009.
- KREYENSCHMIDT, J.; HÜBNER, A.; BEIERLE, E.; CHONSCH, L.; SCHERER, A.; PETERSEN, B. Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 510-520, 2010.
- LINDSAY, R.C. **Aditivos alimentares**. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. Química de Alimentos de Fennema, Porto Alegre: Artmed, 2010, 537-584 p.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Cárita, 2 ed., 2009, 358 p.
- ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 5, p. 501-508, 1996.
- RUSSO, F.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. **Food Microbiology**, v. 23, p. 797-802, 2006.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.M. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Varela, 4 ed., 2010, 624 p.
- SLONGO, A.P.; ROSENTHAL, A.; CAMARGO, L.M.Q.; DELIZA, R.; MATHIAS, S.P.; ARAGÃO, G.M.F.DE. Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. **Food Science and Technology LEB**, v. 42, p. 303-306, 2009.