

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÀRIA
PROGRAMA DE PÒS GRADUAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA E
PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**ESTUDO DO EFEITO INDIVIDUAL
E COMBINADO DA ANAEROBIOSE
ADIÇÃO DE NISINA EM CARPACCIO DE
CARNE BOVINA**

CAMILA DE MELO CESARINO MATIAS

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

**NITERÓI, RJ
2016**

CAMILA DE MELO CESARINO MATIAS

**ESTUDO DO EFEITO INDIVIDUAL E COMBINADO DA
ANAEROBIOSE E ADIÇÃO DE NISINA EM CARPACCIO DE CARNE
BOVINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal como requisito parcial para obtenção do título de Mestre

Orientador:

Profº Drº Robson Maia Franco

Niterói, RJ
2016

CAMILA DE MELO CESARINO MATIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal como requisito parcial para obtenção do título de Mestre

Aprovada em ___ de _____ de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Robson Maia Franco – UFF
Orientador

Prof^ª. Dr^ª Carolina Riscado Pombo - UFF

Prof^ª Dr^ª. Karen Signori Pereira - UFRJ

Niterói, RJ

2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter conseguido chegar até aqui.

A minha mãe, Cristina de Melo Cesarino, pela amizade e compreensão nos momentos de nervosismo, por ser minha melhor amiga, sem você nada disso seria possível.

A minha avó, Maria Magdalena de Mello Cesarino, pelo carinho e dedicação em todas as etapas do trabalho.

A meu avô, Hέλvio Furtado Cesarino (*in memorian*), por me fazer acreditar em Deus e me mostrar que com força de vontade, tudo é possível. Onde quer que você esteja, espero que esteja orgulhoso.

A Cecília de Fátima Rodrigues, pelos lanches, orações, palavras de carinho, por acreditar em mim e sempre lembrar-me de que tudo daria certo.

A meu orientador, Prof. Dr. Robson Maia Franco, pela dedicação e preocupação nas etapas do trabalho, compartilhando seus conhecimentos e sempre me apoiando durante o experimento.

A Professora Dra. Carolina Riscado Pombo, pela paciência e ajuda em todas as etapas do experimento, sempre me motivando e transmitindo seus conhecimentos para que tudo corresse bem.

Ao Professor Dr. Mosar Lemos, pela colaboração em ceder os equipamentos necessários e por compartilhar generosamente seus conhecimentos para a realização do experimento.

Ao Prof. Dr. Elmiro Rozendo do Nascimento, pelo auxílio e paciência na realização do tratamento estatístico.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem ou que seus planos nunca vão dar certo ou que “você nunca vai ser alguém, confie em si mesmo quem acredita sempre alcança” **Renato Russo**

RESUMO

O “Carpaccio” é um produto obtido de carne bovina, ingerido com queijo, azeite e especiarias, consumido cru e que requer excessiva manipulação em seu preparo. Considerando-se a possibilidade de transmissão de patógenos e a ocorrência de surtos alimentares, surge a demanda de implantação de novas tecnologias que preservem a qualidade microbiológica, sem que para isso características sensoriais igualmente importantes sejam perdidas. Objetivou-se, no presente estudo, avaliar o prazo comercial de quatro formulações (Controle - sem qualquer tratamento; Adição de vácuo; Vácuo em conjunto com 0,5% de Nisina e somente adição de 0,5 % de Nisina). As amostras foram adquiridas em entreposto comercial do Município de Niterói, em seguida trazidas para o Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, onde foram pesadas e armazenadas por 24 horas a 4°C sob refrigeração, para descongelamento. Após o descongelamento as amostras de “Carpaccio” foram submetidas aos tratamentos, conforme delineamento experimental realizado em pré-experimento e permaneceram armazenadas à temperatura de 4°C, sendo retiradas alíquotas de 25g a cada 48 horas para realização das análises microbiológicas pertinentes.

Os procedimentos analíticos bacteriológicos realizados foram: Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e Psicotróficas; Contagem de Bactérias Ácido Lácticas e contagem de Enterobactérias. Concluiu-se que a utilização de vácuo combinado a 0,5% de Nisina aumentou em seis dias o prazo comercial do produto quando comparada com a amostra Controle, sem nenhum tipo de tratamento, e a amostra contendo Nisina isoladamente. Evidenciou-se que o sinergismo de técnicas atuou de forma positiva no aumento do prazo comercial das matrizes alimentícias de “Carpaccio”.

Palavras chave: Nisina, “Carpaccio”, Prazo Comercial, CBHAM, CBHAP, BAL,VRBG

ABSTRACT

“Carpaccio” is a product obtained from bovine raw meat, seasoned with grated cheese, olive oil and spices. Considering the need of manipulation and the fact that is submitted to no cooking process whatsoever, food poisoning outbreaks and pathogens transmission are a possibility. Therefore the implementation of new technologies to preserve its microbiological quality, without losing in the process the equally important sensorial characteristics is necessary. This study aimed at evaluating the commercial term of the product when submitted to four formulations (Control – without the addition of any treatment; vacuum addition; vacuum and 0,5% of Nisin; and addition of Nisin). Samples were obtained of a trading post in the city of Niteroi, brought to the laboratory of Microbiological Control for Food of Animal Origin of the University Federal Fluminense, where they have been weighted and stored for 24 hours at the temperature of 4°C in order to be defrosted. After defrosting, the samples were submitted to the treatments, according to the experimental scope project and were stored and maintained at the temperature of 4°C; 25g pieces were withdrawn every 48 hours in order to perform the relevant microbiological analysis.

The analytical procedures performed were: Count of Aerobic Bacteria Mesophilic Heterotrophic and Count of Psychotropic Bacteria; Count of Lactic Acid Bacteria and Count of Enterobacteria. It has been concluded that the use of vacuum and Nisin combination increased the commercial term of the product in 6 days, when compared to the Control sample, without any kind of treatment and the sample treated with Nisin only, demonstrating that synergism techniques may act in a positive way in raising the commercial validity of food matrices of “Carpaccio”.

Key words: Nisin, “Carpaccio”; commercial term; CBHAM, CBHAP, BAL, VRBG.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS, p. 4

RESUMO, p. 6

ABSTRACT, p. 7

SUMÁRIO, p. 8

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 10

LISTA DE TABELAS, p. 11

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p. 12.

1 INTRODUÇÃO, p. 13

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 14

2.1 CARNE BOVINA E MANIPULAÇÃO, p. 14

2.2 “CARPACCIO” DE CARNE BOVINA, p. 15

2.3 PRAZO COMERCIAL, p. 15

2.3.1 **Temperatura**, p. 16

2.4 CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS E MESÓFILAS, p. 17

2.4.1. **Enterobactérias**, p. 18

2.4.2 **Bactérias Ácido Lácticas**, p. 19

2.5 BIOPRESERVAÇÃO, p. 20

2.6 BACTERIOCINAS, p. 21

2.6.1 **Nisina**, p. 24

2.6.2 **Antimicrobianos x Bacteriocinas**, p. 26

2.7 EMBALAGEM A VÁCUO, p.26

3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 29

3.1 MATERIAL PERMANENTE, p. 29

3.1.1 **Material de Consumo**, p. 29

3.1.2 **Colheita acondicionamento e transporte das amostras**, p. 30

3.1.3 **Preparo das subamostras para procedimento analítico**, p. 30

3.2 IMERSÃO EM NISINA, p. 31

3.3 EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO, p. 31

3.4 ANÁLISES, p. 31

3.4.1. **Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias e Mésófilas(CBHAM) e Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrotrólicas(CBHAP)**, p. 32

3.4.2	Contagem de Bactérias Ácido Lácticas (BAL), p. 33
3.4.3	Contagem de Enterobactérias, p. 33
4	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA, p. 35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO, p. 36
5.1	ANÁLISE DA QUALIDADE INICIAL DO “CARPACCIO” DE CARNE BOVINA, p. 36
5.2	CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS E MESÓFILAS, p. 36
5.2.1	Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas (CBHAP), p.38
5.2.2	Contagem de Enterobactérias, p. 40
5.2.3	Contagem de Bactérias Ácido Lácticas (BAL), p. 42
6	CONCLUSÕES, p. 45
7	SUGESTÕES, p. 46
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 47

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1** Crescimento Bacteriano em meio APC, f. 32
- Fig. 2** Colônias características de Enterobactérias em meio VRBG, f. 34
- Fig.3** Comportamento das amostras experimentais em relação à contagem de CBHAM durante estocagem. Controle (sem aditivo); F1 (vácuo); F2 (vácuo + Nisina); F3 (Nisina), f. 37
- Fig.4** Comportamento das amostras experimentais em relação à contagem de Psicrotróficas durante a estocagem: Controle (sem aditivo); F1 (Vácuo); F2 (Vácuo + Nisina); F3 (Nisina), f. 39
- Fig.5** Comportamento das amostras experimentais em relação à contagem de Enterobactérias (VRBG) durante a estocagem: Controle (sem aditivo); F1 (Vácuo); F2 (Vácuo + Nisina); Nisina, f. 41
- Fig.6** Comportamento das amostras experimentais em relação à contagem de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) durante a estocagem: Controle (sem aditivo) F1 (Vácuo); F2 (Vácuo + Nisina); Nisina, f. 43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores médios em $\log_{\text{UFC/g}}$ de CBHAM nas amostras Controle e nos três tratamentos, f. 37

TABELA 2 - Valores médios em $\log_{\text{UFC/g}}$ de CBHAP das amostras Controle e nos três tratamentos, f. 39

TABELA3 - Valores médios em $\log_{\text{UFC/g}}$ de VRBG Enterobacérias nas amostras Controle e nos três tratamentos, f. 41

TABELA 4 - Valores médios em $\log_{\text{UFC/g}}$ de CBAL nas amostras Controle e nos três tratamentos, f. 43

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

BHAM	Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas
BHAP	Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrotróficas
BAL	Bactérias Ácido Lácticas
CO ₂	Gás Carbônico
g	grama
Kg	quilograma
ml	Mililitro
%	Porcentagem
pH	Potencial Hidrogeniônico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFF	Universidade Federal Fluminense

1 INTRODUÇÃO

O “Carpaccio” de carne bovina foi preparado pela primeira vez na segunda metade dos anos ‘50, quando um médico prescreveu a uma nobre veneziana que ingerisse carne crua com o objetivo de curar-se de uma anemia; atendendo ao pedido de sua cliente habitual, Giuseppe Cipriani, proprietário do Harry’s Bar, criou o prato, fatiando a carne previamente embrulhada em papel de cera e, colocando-a no congelador por quarenta e cinco minutos, transformou-a em um sólido bloco de gelo, facilitando o corte em fatias da metade de um milímetro de espessura, a este prato foi dado o nome de “Carpaccio” em homenagem ao pintor Vittore Carpaccio (1465-1525), pois na ocasião uma exposição deste pintor estava fazendo enorme sucesso em Veneza (KOUSTIOUKOVITCH, 2009). O “Carpaccio” de carne bovina é obtido de finas fatias de carne crua, preparada a partir de peças musculares da região do *Semitendinosus* bovino, conhecido como lagarto redondo, ingerido com azeite, queijo parmesão e especiarias diversas. O “Carpaccio” tornou-se prato popular e facilmente encontrado em bares e restaurantes. Para atender a demanda de seu consumo, a produção industrial em larga escala também aumentou significativamente, de modo que o produto pode ser encontrado em lojas de varejo, armazenado em embalagem a vácuo ou atmosfera modificada (LUCQUIN et al; 2012). Com base nas informações divulgadas pelo Ministério da Saúde através da vigilância epidemiológica entre 2000 e 2015, foram notificados 10.666 surtos de doenças transmitidas por alimentos, com 155 óbitos registrados e associados a doenças causadas por agentes etiológicos presentes em matrizes alimentares. Na transmissão de microrganismos patogênicos, diversos alimentos foram comprovadamente envolvidos, e a carne bovina foi associada às classes mais envolvidas, respondendo por 3,4% do total de casos em que o alimento foi identificado como causa (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015).

Objetivando-se reduzir tais surtos, surge a necessidade de alternativas que lhe aumentem a segurança microbiológica e por consequência lhe ampliem o prazo comercial. Pretende-se com este trabalho combinar a adição de Nisina à embalagem a vácuo, verificar seus efeitos do ponto de vista microbiológico e avaliar o prazo comercial dos analitos pesquisados, com o procedimento das seguintes contagens: Bactérias Heterotróficas Aeróbias e Mesófilas, Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas, Bactérias Ácido Lácticas e Enterobactérias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARNES BOVINAS E MANIPULAÇÃO

A carne bovina, em sentido amplo, constitui um alimento nobre para os humanos. A maior contribuição da carne bovina na dieta é devida à quantidade e à qualidade das proteínas, à presença de ácidos graxos essenciais e de vitaminas do complexo B. Entretanto, produtos cárneos crus de intensa manipulação tais como o “Carpaccio” constituem excelente meio de cultura, dada à elevada porcentagem de umidade, pH próximo à neutralidade e composição rica em nutrientes, favorecendo a instalação, o crescimento e a multiplicação de inúmeros microrganismos capazes de provocar a deterioração do produto (ORDONEZ, 2005). A exposição da carne a contaminações ocorre em todas as fases de produção, iniciando-se no abate, prosseguindo no processamento, até a oferta ao consumidor final (PARDI et al; 2006).

Fazer com que a mercadoria chegue ao consumidor final, com as características químicas, físicas e microbiológicas próprias para o consumo é uma tarefa complexa da cadeia produtora. Se houver má conservação ou acondicionamento inadequado dos produtos, lotes inteiros podem ser perdidos devido à quebra na cadeia de frio na qual ocorre elevação de temperatura, havendo alteração nas características organolépticas da carne sem recuperação do produto (BERNARDES, 2010).

O fatiamento é uma etapa crucial no controle de qualidade microbiana do alimento, tendo em vista que superfícies de facas, cortadores e equipamentos, se mal higienizados, acumulam matéria orgânica, propiciando a formação de biofilmes que podem permanecer fortemente aderidos e posteriormente desprender partes, contaminando outras superfícies e produtos alimentícios (CHAVANT et al., 2007). Para fornecer ao consumidor um produto seguro, além de se controlar a presença de microrganismos em alimentos, é essencial verificar e monitorar as condições higiênico sanitárias dos equipamentos e utensílios utilizados no processamento, sendo necessário um efetivo programa de limpeza e sanitização para inativar microrganismos e prevenir o acúmulo de biofilmes nas superfícies (PENG et al; 2002).

2.2 “CARPACCIO” DE CARNE BOVINA

“Carpaccio” é um produto pronto para consumo, elaborado com finas fatias de carne crua, obtidas a partir do músculo *Semitendinosus*. O produto é congelado, fatiado, embalado a vácuo e comercializado sob temperatura de refrigeração (LUCQUIN, 2012). Apesar de cada vez mais apreciado pelo público, o consumo de “Carpaccio” pode ser um risco à saúde dos consumidores. Segundo Franco et al. (2012), os alimentos crus, matérias primas tais como leite e vegetais crus, bem como carne crua de animais de açougue - categoria na qual se inclui o “Carpaccio” - são potenciais fontes de patógenos como, *Listeria monocitogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp., *Eschericia coli* e *Staphylococcus* spp

2.3 PRAZO COMERCIAL

O prazo comercial de carnes e produtos cárneos pode ser definido como o tempo de armazenamento até a deterioração. Este prazo comercial é controlado basicamente por fatores intrínsecos, extrínsecos e propriedades da embalagem (ROBERTSON, 2006), sendo ainda dependente do número, tipo e taxa de crescimento dos microrganismos que podem estar presentes nos alimentos. O ponto de deterioração pode ser definido pela contagem bacteriana máxima aceitável pela ICMSF; ou por alterações físicas e químicas que modifiquem a aparência do alimento, tornando-o repugnante ao consumo e ainda a produção de odores desagradáveis conhecidos por “offflavours” (BORCH; BLIXTS; KANT-MUEMANS;1996).

Diversos fatores influenciam na redução do prazo comercial dos produtos fatiados, como a excessiva manipulação e a maior superfície de contato com o oxigênio favorecendo a oxidação lipídica e a contaminação do alimento por microrganismos deteriorantes e patogênicos. Para solucionar esses problemas muitas indústrias comercializam produtos fatiados, acondicionados em embalagem a vácuo ou em atmosfera modificada (BRESSAN et al.; 2007).

Segundo Gottardi (2006) a etapa de fatiamento deve ser considerada um ponto crítico de controle, pois submete produtos que atendem a uma expressiva parcela da população à manipulação excessiva e ao conseqüente risco de contaminação cruzada, na mesma ordem do ambiente industrial. Produtos fatiados geralmente não são tratados

termicamente após a comercialização, sendo destinados ao pronto consumo. Este fato exige da cadeia produtora e distribuidora de alimentos a garantia de atendimento aos parâmetros bacteriológicos até o momento do consumo.

2.3.1 Temperatura

Com o aumento da população mundial e a necessidade de fornecer alimentos frescos e saudáveis, a conservação de alimentos se torna cada vez mais necessária a fim de aumentar a vida útil e a manutenção do valor nutricional dos alimentos (KAALE, 2011).

Neste âmbito o armazenamento de alimentos, utilizando baixas temperaturas é de longe a medida de preservação de alimentos frescos mais comumente utilizada durante a produção e distribuição (ERCOLINI et al; 2009). A utilização de frio é considerada o método mais eficaz para retardar ou inibir o crescimento de microrganismos em produtos cárneos, durante o transporte, ou armazenamento e pode ajudar a manter a segurança e prolongar a vida útil desses produtos (AL-JASSER, 2012). Considera-se a temperatura ideal de refrigeração de 4°C e temperatura ideal de congelamento -18°C.

Basicamente o frio conserva os alimentos porque retarda ou inibe a multiplicação microbiana (JAY, 2010). Isso ocorre porque temperaturas de refrigeração diminuem a velocidade de reações químicas e bioquímicas; além disso, a conservação é possível, pois a baixas temperaturas a fluidez da membrana é diminuída e com isso diminui-se também a velocidade de reações enzimáticas, responsáveis pelo metabolismo microbiano. Contudo, microrganismos psicotróficos conseguem se desenvolver a baixas temperaturas, pois tem a habilidade de modificar sua membrana plasmática, aumentando a quantidade de ácidos graxos insaturados, que mantém esta membrana em estado semifluido, facilitando o transporte de nutrientes e enzimas (MADIGAN et al.; 2010). Desse modo, a capacidade desses microrganismos psicotróficos de crescerem em temperaturas de refrigeração, torna o controle da sanidade e da qualidade da carne um desafio (HERNANDEZ; MACEDO; CONTRERAS; CASTILLO, 2011). Portanto, diante do cenário atual, com o aumento do consumo em massa de carne fresca e de produtos cárneos, bem como os novos padrões de consumo, como redução do tempo de

cozimento com mínima perda de qualidade, tem acentuado a busca e controle sistemático e constante da temperatura de produtos de carne crua (KOUTSOUMANIS; TAOUKIS, 2005).

Segundo a RDC 216, do ano de 2004 o prazo máximo de consumo de alimentos preparados e conservados sob refrigeração à temperatura de 4°C ou inferior deve ser de cinco dias. Quando forem utilizadas temperaturas superiores a 4°C, o prazo de consumo deve ser reduzido de forma a garantir as condições higiênico-sanitárias dos alimentos (BRASIL, 2004). Contudo, não há prazo comercial estabelecido especificamente para produtos fatiados em estabelecimentos comerciais, tais como o “Carpaccio” de carne Bovina e o Presunto de Peru Fatiado.

2.4 CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS E MESÓFILAS

Os microrganismos individualmente ou em grupos crescem em uma ampla faixa de temperatura. Os mais comumente encontrados em carne fresca são os mesófilos, que apresentam velocidade de crescimento entre 20 e 45°C, e tem como temperatura ótima de crescimento entre 30 e 40°C (JAY, 2010).

A contagem de bactérias Heterotróficas Aeróbias e Mesófilas (BHAM) é indicador geral de populações bacterianas nos alimentos. Embora não diferencie tipos de bactérias, pode ser útil na avaliação da qualidade geral do produto, indicando se as práticas de manipulação, matérias primas utilizadas, condições de processamento e prazo comercial foram adequadas (SILVA et al.; 2010).

Diversos autores como Motta e Belmonte (2000), Julião e Costa (2002); Lundgren et al, (2009) e Silva et al. (2010) utilizaram a contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias e Mesófilas como parâmetro na avaliação da qualidade da carne bovina.

Os psicrotróficos são microrganismos que crescem em alimentos sob refrigeração entre 0 e 7°C, mas tem como temperatura ótima de crescimento 20°C. Na classificação tradicional dos microrganismos em função da temperatura, os psicrotróficos pertencem a um subgrupo dos mesófilos e estão distribuídos em diversos

gêneros incluindo cocos e bastonetes esporogênicos e não esporogênicos (FRANCO; LANDGRAFF, 2008).

A contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrotróficas avalia o grau de deterioração de alimentos refrigerados (FRANCO; LANDGRAFF, 2008). Algumas bactérias patogênicas também são psicrotróficas, incluindo *Listeria monocytogenes* e algumas estirpes de *E. coli* enteropatogênica (SILVA et al., 2010).

Na literatura não há estudos correlacionando os resultados de Bactérias Heterotróficas Aeróbias e Psicrotróficas em carne bovina fatiada, porém existem diversos autores que avaliaram similarmente a carne bovina moída. A maioria dos autores estabelece elevadas médias de contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias e Mesófilas e Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrotróficas como 7,48log UFC/g (LUNDGREN et al., 2009), 7,2 logUFC/g. Julião e Costa, (2002) e 6,17 log UFC/g (MOTTA, BELMONT; 2000). Segundo a “International Commission on Specification for Foods”, quando um alimento atinge 7 log UFC/g a validade comercial do produto torna-se comprometida.

Embora a Legislação Brasileira (BRASIL, 2004) não estabeleça limites de tolerância para o grupo de mesófilos e psicrotróficos, populações elevadas deste grupo representam qualidade higiênico-sanitária deficiente, muitas vezes por má qualidade da matéria prima, aliada a tempo e temperatura de estocagem inadequados (SILVA et al; 2001). De Marchi et al., 2012 observaram amostras que mesmo de acordo com a legislação vigente, que determina somente a ausência de *Salmonella* spp. em 25g, apresentavam elevadas contagens de diversos microrganismos deteriorantes e patogênicos, ocasionando riscos de toxinfecções alimentares.

2.4.1 Enterobactérias

Apesar de serem geralmente associados à contaminação de origem fecal, os integrantes da família Enterobacteriaceae estão amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados não só no trato intestinal de humanos e animais de sangue quente, como também no ambiente. A contagem de Enterobactérias pode ser utilizada como indicador de condição higiênica dos processos de fabricação de alimentos, visto que são facilmente inativadas por sanitizantes e capazes de colonizar vários nichos de plantas de

processamento quando a higienização é falha (JOHNSON;KORNAKI,2001)Conforme consta na segunda edição do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, as Enterobactérias possuem número crescente de gêneros e espécies, sendo 44 gêneros e 176 espécies até 2005 (BRENNER et al; 2005). Devido às grandes quantidades de gêneros e espécies muitas vezes a ação de antimicrobianos é dependente da dominância de uma espécie (PAPADOPOULOS et al., 2003; SILVA et al; 2013).

O estufamento em embalagens a vácuo de carnes refrigeradas, também conhecido como “blownpack”, é atribuído a algumas espécies de Enterobactérias; caracteriza-se pela abundante produção de gás, induzindo à completa distensão da embalagem durante o processo de estocagem sob refrigeração. Quando a embalagem é aberta, há um odor desagradável de queijo com ou sem coloração sulfurosa aparente além de exsudações (FELIPE, 2008). Além das perdas econômicas devido ao “blownpack”, contaminações com Enterobactérias resistentes a antibióticos podem ser uma ameaça à saúde coletiva visto que as bactérias determinantes de resistência podem ser transferidas entre carnes refrigeradas (FELIPE, 2008).

2.4.2 Bactérias Ácido Lácticas

Bactérias Ácido Lácticas pertencem a um grande grupo de microrganismos naturalmente encontrados em alimentos, inclusive o leite e derivados que incluem os gêneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*; *Weissella*, *Microbacterium*, *Bifidobacterium* e *Propionibacterium* (Holzapfel et al; 2001). Os microrganismos pertencentes a este grupo possuem diversas características metabólicas, morfológicas e fisiológicas em comum: são Gram positivas, não formadoras de esporo, catalase negativa, fastidiosas anaeróbicas, aerotolerantes e ácido tolerantes, possuem metabolismos fermentativo, sendo o ácido láctico o principal produto final (AXELSSON, 2004;LEROY;VUYST 2004).

O processo de fermentação pode ser homo ou heterofermentativo. No primeiro caso são geradas moléculas de lactato, como ocorre com o *Streptococcus* e *Lactococcus*; no segundo, são produzidos lactatos, etanol e dióxido de carbono, em *Leuconostoc* e

alguns lactobacilos (PARADA et al; 2007). As bactérias lácticas são predominantemente psicotróficas, mas algumas linhagens conseguem crescer abaixo de 5°C ou acima de 45°C. São denominadas bactérias lácticas por produzirem ácido láctico. Além da produção deste ácido, outros compostos antimicrobianos são produzidos, incluindo ácidos orgânicos, como o ácido acético e o propiônico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que interferem na força promotiva e nos mecanismos de transporte ativo da membrana citoplasmática bacteriana (FORSYTHE, 2010).

A segurança microbiana de alimentos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada deve-se em grande parte à presença das bactérias lácticas e similares em carnes frescas. Nestes alimentos, quando estocados a baixas temperaturas, sob baixo CO₂, as bactérias lácticas inibem o crescimento de patógenos, devido à competição pelo oxigênio remanescente no meio e pela produção de ácidos que tornam o pH do meio baixo inviabilizando o crescimento de microrganismos tais como a *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp.

2.5 BIOPRESERVAÇÃO

A biopreservação refere-se à extensão da validade comercial dos alimentos e ao aumento da segurança microbiológica, usando uma microbiota natural ou controlada e seus produtos antibacterianos (HUGAS, 1998). A biopreservação pode ser aplicada em alimentos, especificamente em produtos cárneos por quatro métodos básicos. O primeiro método é adicionar um cultivo puro de bactérias ácido lácticas, viáveis, produtoras de bacteriocinas, que devem ser capazes de competir com a microbiota natural do alimento, não devem ter impacto nas características físico-químicas e sensoriais do alimento e não devem produzir gás, nem exopolissacarídeos para evitar o estufamento da embalagem (HUGAS;1998).

O segundo método é adicionar microrganismos mesófilos como proteção ao abuso de temperatura; neste caso, a cepa bioprotetora crescerá competitivamente com a cepa patogênica e em condições de abuso de temperatura; a cepa bioprotetora pode inclusive atuar como predominante, assegurando que bactérias patogênicas não cresçam, evitando assim que o alimento se deteriore. O terceiro método propõe-se a adicionar o extrato cru de bacteriocinas, ou extratos concentrados obtidos por bactérias

ácido lácticas, produtoras de bacteriocinas; este método evita custos na purificação de cada composto. O quarto e último método refere-se a adicionar substâncias antagônicas ou semipuras como as bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas; ao usar este método, a dose de bacteriocinas é mais precisa, porém mais perecível, a aplicação se limita conforme a regulação concernente a aditivos em alimentos de cada país (HUGAS, 1998). Grande parte dos estudos sobre biopreservação nos últimos anos está concentrada sob bacteriocinas, principalmente a Nisina, enfatizando sua detecção, produção, purificação, mecanismo de ação, caracterização bioquímica, microrganismos inibidores ou sensíveis e aplicação com êxito na biopreservação de alimentos (HUGAS; 1998).

2.6 BACTERIOCINAS

O termo bacteriocinas refere-se a peptídeos antimicrobianos que atuam contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, sendo o microrganismo produtor portador de mecanismos específicos de imunidade que a protegem de suas próprias bacteriocinas.

A produção de bacteriocinas ocorre de forma natural na fase logarítmica do crescimento microbiano ou ao final desta fase, possuindo relação direta com a biomassa produzida. As bacteriocinas possuem ação bactericida ou bacteriostática sobre microrganismos relacionados. O crescente interesse da pesquisa e da indústria de alimentos sobre o tema se dá devido ao potencial de aplicação das bacteriocinas na preservação de alimentos, uma vez que pode substituir ou reduzir a adição de conservantes químicos, sem interferir na qualidade sensorial e nutricional do alimento (ACUNA et al;2011,KAUR et al.; 2012,VASQUEZ et al.; 2009,;). Para que o potencial bioconservador de uma bacteriocina possa ser aproveitado na indústria de alimentos, a mesma deverá cumprir alguns requisitos pré-estabelecidos, tais como: ser termoestável, isto é, não coagular a altas temperaturas de cocção; não apresentar risco à saúde do consumidor (risco de intoxicação, se ingerido, ou acarretar resistência a outros microrganismos); apresentar amplo espectro de inibição sobre os principais patógenos de alimentos - a exemplo da inibição de *Listeria monocitogenes* por bactérias lácticas - ou ser altamente específica sobre algum deles; ser uma substância probiótica, isto é, um alimento usado como parte de uma dieta normal e que demonstre benefícios fisiológicos ou reduza o risco de doenças crônicas, além de funções nutricionais básicas; e ser

resultante de uma linhagem microbiana produtora com o status “*Generally Recognized as Safe*” (GRAS) determinado pela “Food and Drug Administration” e incluído em uma lista de substâncias não agressivas à saúde. A Nisina é a única bacteriocina incluída nesta lista, que cumpre todos estes pré-requisitos (AGRAWAL; DHARMESH, 2012; NASCIMENTO et al; 2008;)

Na natureza, a produção de bacteriocinas pode ser detectada tanto em diferentes microrganismos Gram positivos, quanto em Gram negativos; porém os Gram positivos estão relacionados com uma maior diversidade e abundância de produção do que as bactérias Gram negativas. Contudo, as bacteriocinas sintetizadas por bactérias ácido lácticas (BAL) tem concentrado atenção considerável por parte dos pesquisadores e da indústria devido ao seu potencial como biopreservativo em alimentos, que é decorrente da ação inibitória sobre patógenos e deterioradores de alimentos e também como potencial de aplicação na terapêutica (KAUR et al; 2011).

Parada et al; (2007) mencionaram que as bacteriocinas formam um grupo bastante heterogêneo considerando seu espectro antimicrobiano de ação, espécies produtoras, peso molecular, estabilidade, propriedades físico-químicas e modo de ação. Um tipo mais clássico, onde o espectro de ação antimicrobiano é efetivo apenas contra espécies homólogas e um segundo tipo, menos comum que possuem amplo espectro de ação contra microrganismos Gram positivos. Bacteriocinas ativas contra bactérias Gram negativas não são frequentes, pois a membrana externa dessas bactérias funciona como uma barreira permeável para a célula, dificultando e/ou impedindo que essas moléculas alcancem a membrana citoplasmática microbiana.

As bacteriocinas de bactérias lácticas são geralmente estáveis ao calor, são degradadas pela ação de enzimas proteolíticas do trato intestinal humano e não induzem alterações nas propriedades organolépticas dos alimentos, representando uma ação atrativa para a indústria. Além disso, a combinação de ácido láctico e das bacteriocinas também pode ser efetiva contra bactérias oportunistas indesejáveis em alimentos fermentados (DELBONI, 2009).

A nomenclatura das bacteriocinas é contraditória e ainda está em discussão. Algumas bacteriocinas recebem nomes conforme suas espécies bacterianas produtoras,

mas mesmo essa nomenclatura dá origem a contradições. Às vezes os nomes dos gêneros são utilizados como raízes dos nomes, como é o caso dos *Enterococcus* cujas bacteriocinas denominam-se Enterocinas (COTTER et al; 2005).

Diversas classificações foram propostas, sendo a mais recente por Heng, 2007. Esses peptídeos formados pelas bactérias Gram positivas são agrupados em quatro classes, de acordo com sua estrutura química e função biológica.

Classe I: Lantibióticos (possuem o aminoácido lantionina (Lan) na sua estrutura e são subdivididos em três grupos:

Subclasse Ia: bacteriocinas com estrutura linear

Subclasse Ib: bacteriocinas com estrutura globular

Subclasse Ic: bacteriocinas formadas por mais de um componente

Classe II: peptídeos não modificados (não lantibióticos e não cíclicos) de peso molecular inferior a 10 kDa também subdivididos em três grupos:

Subclasse IIa: bacteriocinas ativas contra *Listeria monocytogenes*

Subclasse IIb: bacteriocinas de baixo peso molecular que inibem o desenvolvimento das células alvo por outros meios que não a lise celular

Subclasse IIc; bacteriocinas variadas de baixo peso molecular e que não se enquadram em a e b.

Classe III: Bacteriocinas, proteínas peptídeos de peso molecular superior a 10kDa subdividido em 2 grupos:

Subclasse IIIa: peptídeos que agem causando lise celular

Subclasse IIIb: bacteriocinas de alto peso molecular que inibem o desenvolvimento das células alvo por outros meios que não a lise celular

Classe IV: proteínas complexas que requerem associações com lipídeos e carboidratos para apresentarem atividade.

A classe dos lantibióticos tem recebido maior atenção nos últimos anos devido à Nisina, uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, utilizada comercialmente como preservante de alimentos em muitos países. A Nisina pertence à Classe I, que inclui moléculas flexíveis e alongadas, que tem carga positiva e atuam na despolarização de membrana (MOLLOY, 2014).

2.6.1 Nisina

A Nisina é uma bacteriocina produzida por linhagens de *Lactococcus lactis* subespécie *lactis*, amplamente utilizada na indústria de alimentos como cultura “starter” na composição de fermentos lácticos para o processamento de queijos. A introdução da Nisina para uso comercial se deu na Inglaterra em 1953; no ano de 1988 foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso como conservante em alimentos e reconhecida como GRAS (*Generally regarded as safe*). Tornou-se então a primeira bacteriocina aprovada para uso comercial em aplicações alimentares no processamento de leite e derivados, tendo seu uso aprovado em mais de 50 países (COTTER, 2005; DEEGAN, 2006; DELVES–BROUGHTON, 2003; KLAENHAMNER; WILLIAN; 1993) No Brasil a aplicação de Nisina é autorizada na concentração máxima de 12,5mg/kg de produto final para todos os tipos de queijo (BRASIL, 1996) e na superfície externa de salsichas, na concentração máxima de 200ppm em solução de ácido fosfórico (CASTRO, 2002).

Comercialmente a Nisina é produzida pela “Applin e Barret”, sendo distribuída no Brasil pela empresa Danisco, com a denominação de Nisaplin, cuja composição é: Nisina (1,026UI/mg), Cloreto de Sódio (74,7%), proteínas (17,12%) umidade (1,7%) Chumbo (0,15ppm), Arsênio (<0,5ppm), Zinco (9,2 ppm) e Cobre (0,5ppm). Segundo dados do fabricante, 100mg de Nisaplin possuem 2,5g de Nisina (2,5%), ou seja, em 1mg de Nisaplin há 10^4 Unidades Internacionais (UI). Este mesmo fabricante recomenda o uso de 1-5 gramas de Nisaplin por quilo do produto final, dependendo da validade comercial desejada, bem como da condição microbiológica da matéria prima (DELVES- BROUGHTON, 1990).

A ação antimicrobiana imposta pela Nisina é determinada através de duplo modo, uma vez que impede a síntese de peptidoglicano e determina a formação de poros na parede celular, conduzindo a rápida morte da célula por efluxo de metabólitos (COTTER; HILL; ROSS, 2005). Assim atua de forma eficiente no controle de bactérias Gram positivas, porém é ineficaz contra bactérias Gram negativas, visto que a parede celular destas bactérias possui maior permeabilidade (DELVES-BROUGHTON, 2005). Em diversos estudos, pesquisadores demonstraram que a aplicação de Nisina em produtos cárneos pode inibir a multiplicação de microrganismos deteriorantes e patogênicos, aumentando a validade comercial dos mesmos. Raju, Schmasundar e Udupa (2003), verificaram aumento na validade comercial de salsichas contendo Nisina de dois para vinte dias, quando armazenadas em temperatura ambiente e de 30 para 150 dias quando armazenadas sob refrigeração. Ercolini et al., 2010; Ettayeb; Hassani Rossi; Yamani; (2000), analisaram a utilização da embalagem impregnada com Nisina e ácidos graxos (Eugenol, Carvacol e Timol) frente à *Listeria monocytogenes* e concluíram que a combinação possibilitou reduzir as concentrações de Nisina e, conseqüentemente, minimizar as chances de surgimento de patógenos resistentes. Singh; Falahee e Adams, (2001) ao experimentarem o uso de Nisina e extrato de alho combinados também obtiveram um resultado de efeito sinérgico na redução de *Listeria monocytogenes* em meio de cultura líquido, sugerindo benefícios na adição de Nisina a alimentos. Em salsichas cozidas embaladas a vácuo e armazenadas sob refrigeração a adição de 1,25 a 6,25mg de Nisina por quilo de produto ou imersão da salsicha cozida em solução de 5,0 a 25,0 mg por litro, foi observado o aumento da validade comercial das amostras (DELVES-BROUGHTON, 2005). Apesar dos benefícios ocasionados pela adição de Nisina alguns autores discordam de seu uso isoladamente. Castro, (2002), observou que o tratamento superficial de salsichas com Nisina (200ppm de Nisaplin em solução de ácido fosfórico 0,1%), não foi efetivo na redução significativa na população de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e Psicrotróficas e Bactérias Lácticas independente da temperatura de 8 ou 37° C. Wang, (2000) e De Martinis; Alves; Franco, (2002), analisando o efeito da Nisina em linguiças frescas não encontraram diferenças significativas durante o período de estocagem; este fato pode ser explicado pela perda de solubilidade e interação da Nisina com componentes do alimento (proteínas, lipídeos dentre outros).

2.6.2 Antimicrobianos X Bacteriocina

Devido aos seus efeitos antimicrobianos, frequentemente as bacteriocinas são confundidas com “antimicrobianos”, o que muitas vezes por prejulgamento pode inviabilizar seu uso em alimentos e na medicina (ANANOUE et al., 2007 COTTER et al., 2013, GILLOR et al; 2008). As bacteriocinas são sintetizadas nos ribossomos; possuem aspecto bactericida restrito, atuam na formação de poros na membrana celular e/ou interferem na biossíntese da parede, proteínas DNA, RNA possuem toxicidade desconhecida em células eucarióticas; são em geral termorresistentes; inativas na presença de enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal. Reconhecendo estas diferenças, Hurst (1981) designou as bacteriocinas como preservativo alimentar biológico, porém há a preocupação que o contato com as bacteriocinas, apesar de não serem antimicrobianos, possam conferir aos organismos maior resistência a antimicrobianos. Cleveland et al., (2001) relataram experimentos que se basearam na exposição de microrganismos resistentes a algum antimicrobiano. Em contato com a bacteriocina não foi observada alteração na frequência de resistência aos antimicrobianos. Também foram avaliados microrganismos citados como resistentes à bacteriocina testada e o resultado foi o mesmo, não havendo cruzamento de resistência. Concluiu-se que a resistência deve ser atribuída à diferença no modo de ação. A resistência a antimicrobianos geralmente é associada com determinação genética, facilitando assim a transferência de resistência entre células, estirpes e espécies ao passo que a resistência à bacteriocina resulta de alteração fisiológica da membrana celular.

2.7 EMBALAGEM A VÁCUO

A embalagem a vácuo é empregada no acondicionamento de peças inteiras, ou de pequenas porções, onde se objetiva proteger o produto cárneo do contato com o ar, uma vez que o oxigênio favorece o crescimento de microrganismos aeróbios, que possuem alta capacidade de deterioração e modificam o odor, a cor e a aparência, resultando na rancidez oxidativa das gorduras. Os microrganismos aeróbios causam ainda alterações no pigmento das carnes e destroem algumas vitaminas e aromas. Na ausência de oxigênio as bactérias lácticas predominam e causam menor alteração mesmo em altas contagens (SARANTOPOULOS, 1991). Quando um produto é acondicionado em uma embalagem com barreira a gases, altera-se radicalmente a atmosfera ao seu redor. A

pequena quantidade de oxigênio remanescente no interior da embalagem é consumida pela atividade metabólica da carne e das bactérias, criando-se assim um microsistema anaeróbio/microaerófilo dentro da embalagem que, auxiliado pelo efeito inibitório do CO₂ liberado pela respiração dos microrganismos, desacelera o crescimento de bactérias deteriorantes tais como a *Pseudomonas*, permitindo a predominância de bactérias ácido lácticas, que tem menor ação deteriorante e crescimento limitado a baixas temperaturas. O resultado é o aumento do prazo comercial (ANJOS; OLIVEIRA; SARANTOPOULOS 1994). Nas embalagens a vácuo, a taxa de permeabilidade ao oxigênio do material influi diretamente no prazo comercial do produto, pois a entrada de até mesmo uma pequena quantidade de oxigênio gera uma baixa pressão parcial desse gás, suficiente para a oxidação do pigmento de carnes frescas e curadas. Entretanto, a presença de lacres de identificação da marca, grampos e outras regiões pontiagudas exigem embalagem com alta resistência à perfuração. A perfuração do filme provocará perda do vácuo e, conseqüente, falha do sistema de conservação; por esta razão boas características de termossoldagem também são fundamentais para manter a integridade do alimento. Na embalagem a vácuo, microrganismos psicrotróficos, mesófilos e bactérias anaeróbias podem crescer devido a perfurações e abusos de temperatura, causando diferentes tipos de deterioração. Segundo Nicolai et al. (1993); Devere Devlieghre e Veirmere (2004), para carnes embaladas a vácuo a deterioração à temperatura abaixo de 20°C é dominada pelo crescimento anaeróbio de bactérias ácido lácticas que produzem na sua maioria ácido láctico, causando um odor forte após um determinado tempo de estocagem.

É de conhecimento na comunidade científica, que outros gêneros tais como *Clostridium* e *Enterobacteriaceae* podem crescer e se multiplicar em embalagens a vácuo, causando deterioração e distensão da embalagem à temperatura de refrigeração. Estes microrganismos têm sido submetidos a diversos estudos. Espécies de *Clostridium* que são capazes de se multiplicar à temperatura de refrigeração têm sido identificadas como causadores de estufamento em embalagens a vácuo. Recentemente, novos gêneros tais como os da família *Enterobacteriaceae* também foram identificados por semelhante problema em embalagens a vácuo (BRIGHTWELL et al. 2007). Outros microrganismos foram identificados na deterioração de carnes embaladas a vácuo tais como o *Acinetobacter* e a *Serratia*; porém, não ocasionaram o estufamento da embalagem (ERCOLINI, 2010); no entanto, produzem aminas e metabolizam aminoácidos,

causando putrefação da carne. Devido à produção de aminas e amônia, o pH da carne torna-se alcalino, levando a uma coloração de rósea a avermelhada, que causa aparência repugnante à carne (BHUNIA;RAY,2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense. E a seguir constam o material e a metodologia utilizados no desenvolvimento do estudo.

3.1 MATERIAL PERMANENTE

O material permanente necessário para a realização das análises estava disponível nos laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Fluminense:

- Autoclave
- Balança analítica
- Banho-maria;
- Bico de Bunsen
- Contador de Colônias Mecânico (Phoenix® CP602);
- Estufa bacteriológica (Thermolyne® 42000);
- Fogão
- Geladeira
- Homogeneizador tipo “stomacher”
- Microscópico óptico
- Pipeta automática (1ml)

3.1.1 Material de Consumo

Uma grande parte do material de consumo como meios de cultura e reagentes utilizados no estudo encontravam-se disponíveis para uso no laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal.

A vidraria utilizada foi previamente esterilizada a 170°C por uma hora e as soluções e meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave, conforme suas respectivas especificações.

3.1.2 Colheita acondicionamento e transporte das amostras

As amostras de “Carpaccio” foram obtidas aleatoriamente em entreposto comercial localizado no Município de Niterói, no Estado do Rio de Janeiro.

O estudo observacional foi realizado de modo transversal, onde cada amostra foi analisada apenas uma vez. Para o cálculo amostral foi utilizado o método de amostragem descrito por Di Giacomo e Koepsell (1986) e Martin Meek e Willerberg, (1987) conforme a prevalência estimada de 15% com probabilidade de erro de 10% encontrada em trabalhos anteriormente revisados sobre carne bovina moída, visto que não existem estudos com “Carpaccio”. Desta forma foram analisadas 30 amostras ao todo. A aquisição foi realizada de forma semelhante a um consumidor comum e a temperatura do produto foi aferida com termômetro digital tipo espeto, previamente higienizado com álcool a 70%. Em seguida foram acondicionadas em recipiente isotérmico de poliestireno expandido e transportadas até o Laboratório de Controle Microbiológico de produtos de origem animal da Universidade Federal Fluminense-UFF, onde permaneceram estocados a 4,0°C até a realização das análises bacteriológicas em no máximo 24 horas após a colheita, respeitando os limites propostos pelo “Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods”, que determina como regra geral para alimentos refrigerados o transporte e estocagem deve ser entre 0 e 4,4°C e o intervalo máximo de 36 horas entre a colheita e a análise (MIDURA; BRYANT, 2001).

3.1.3 Preparo das subamostras para procedimento analítico

No interior da câmara asséptica, após a sanitização da bancada com álcool a 70%, exposição à luz ultravioleta por 15 minutos e lavagem e desinfecção das mãos na zona de segurança. a embalagem contendo a amostra foi aberta com assepsia na zona de segurança da chama do Bico de Bunsen, com o auxílio de instrumentos flambados ao rubro e esfriados; foram retiradas as unidades analíticas para cada tipo de ensaio e pesada em balança analítica (Martec®LCI). Para o ensaio de presença ou ausência de *Salmonella*, foram adicionadas 25g da amostra e adicionados 225 ml de Água Peptonada Tamponada (Himedia®M227) em embalagem estéril para homogeneização em “Stomacher” (Seward®80) em velocidade normal, durante dois minutos. Deu-se

prosseguimento aos tratamentos, quando a matriz alimentícia apresentou resultado negativo para *Salmonella spp.*

3.2 IMERSÃO EM NISINA

Para as amostras tratadas com a bacteriocina Nisina após 2 minutos de imersão em solução aquosa de Nisaplin® as amostras de “Carpaccio” foram retiradas de forma asséptica do banho, deixando escorrer a solução por 1 minuto. As soluções foram preparadas com água destilada e esterilizada previamente em autoclave.

A Nisina utilizada neste experimento possui uma concentração de 100mg/ml conforme determinação do fabricante. As embalagens ficaram armazenadas em refrigerador com temperatura controlada de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 42 dias de experimento sendo retiradas alíquotas a cada 48 horas para as Contagens de CBHAM, CBHAP, BAL e VRBG.

3.3 EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

As amostras foram acondicionadas em embalagem plástica de alta permeabilidade aos gases, em seguida selados em termosseladora a vácuo, onde se deu a formação de vácuo (50/50 CO_2). As amostras do grupo controle e do grupo Nisina foram seladas em 100% de ar atmosférico. A fim de minimizar as alterações de temperatura tanto no preparo das amostras quanto na fase de embalagem; as ações foram rápidas e em etapas para que todas as unidades amostrais ficassem o menor tempo possível fora da refrigeração.

3.4 ANÁLISES

As análises bacteriológicas foram realizadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da UFF em Niterói, RJ. Esta etapa incluiu o preparo dos meios de cultura e soluções diluentes, esterilização dos mesmos, lavagem de vidrarias, esterilização do material sujo antes do descarte adequado e outras atividades necessárias ao perfeito cumprimento das atividades analíticas laboratoriais.

3.4.1 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas (CBHAP)

A contagem de CBHAM e CBHAP foi realizada nos 8°, 11°, 13°, 15°, 20°, 28°, 32°, 34°, 38° e 40° dias, seguindo a recomendação da Instrução Normativa n° 62 e American Public Health Association (APHA, 2001).

As embalagens a vácuo de cada amostra foram assepticamente abertas e retiradas alíquotas em cinco pontos diferentes totalizando 25g. Posteriormente foram homogeneizadas em envelopes plásticos esterilizados no equipamento stomacher (Seward® 80) com 225 ml de solução salina peptonada a 0,1%, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} , a partir desta diluição foram transferidas alíquotas de 1 ml, diluídas em tubos de ensaio, formando desta forma a diluição 10^{-2} e sucessivamente. Cada diluição foi distribuída em quatro placas de Petri e homogeneizada com 20 ml do meio Ágar Padrão para Contagem (APC), da marca Himedia (ref. MO91), fundido e resfriado a 46°, imediatamente homogeneizado a amostra. As placas referentes à contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias e Mesófilas (CBHAM) após completa solidificação foram incubadas a 35-37° por 48 horas e as referentes a Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas foram incubadas a temperatura de geladeira a 4°C por sete dias. Após o período de incubação as placas que no Contador de Quebec (Figura1) obtinham resultados entre 25 e 250 UFC/g foram selecionadas para o resultado final.

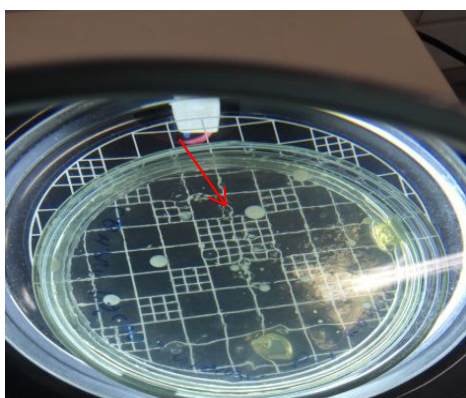


Fig.1 Crescimento Bacteriano no meio APC.

3.4.2 Contagem de Bactérias Ácido Lácticas

A contagem de BAL foi realizada nos 8°, 11°, 13°, 15°, 20°, 28°, 32°, 34°, 38° e 40° dias, seguindo a recomendação da Instrução Normativa nº 62 e da American Public Health Association (APHA, 2001). Para distribuição uniforme do crescimento de colônias, homogeneizou-se o inóculo com o meio, formando uma primeira camada e após a solidificação foi vertido mais aproximadamente 10ml do mesmo meio para formar uma segunda camada, propício ao crescimento destas bactérias, sendo posteriormente incubadas a 35-37° C por 48 horas.

Após a incubação foram realizadas a seleção e a contagem das placas com crescimento entre 20 e 200 UFC. Após a contagem foram selecionadas duas colônias de cada placa, sendo uma para a prova da catalase e outra para observação das características morfo-tintoriais. Para a prova da catalase uma colônia foi transferida para uma lâmina, contendo uma gota de peróxido de hidrogênio 3%. Foram consideradas negativas as amostras que não apresentaram formação de bolhas.

Para a observação das características morfo-tintoriais foi realizado esfregaço que em seguida foi corado pelo método de Gram e visualizado no microscópio óptico. Os cultivos que apresentaram a prova da catalase negativa e presença de cocos ou bastonetes Gram-Positivos foram considerados BAL. Para o cálculo final foi multiplicado o número de UFC contadas pela diluição da placa.

3.4.3. Contagem de Enterobactérias

A contagem de Enterobactérias foi realizada nos 8°, 11°, 13°, 15°, 20°, 28° e 32° dias, seguindo a metodologia preconizada pela Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Em placas de Petri esterilizadas foram semeados 1 ml das diluições das amostras. Em seguida foi vertido aproximadamente 10 ml do Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro, Bile Glicose da marca Acumedia (ref.7425A), fundido e resfriado a 46° C que já se encontrava em banho maria. O meio e o inóculo foram homogeneizados e, após a solidificação da primeira camada, adicionou-se a segunda camada do meio de cultura,

sendo este método denominado “pour plate”. As placas foram incubadas em estufa por 35-37°C por 48 horas. Na composição do meio VRBG é evidenciada a habilidade dos microrganismos em fermentarem a glicose com produção de ácido, reação sinalizada pela viragem do indicador a vermelho ao precipitarem sais biliares que absorvem o vermelho neutro sendo assim observado a formação de halo vermelho ao redor das colônias. As placas referentes à diluição que apresentavam colônias entre 25 e 250 Unidades Formadoras de Colônia (UFC), foram selecionadas para o resultado (Figura 2) ao serem contadas no contador tipo Quebec.

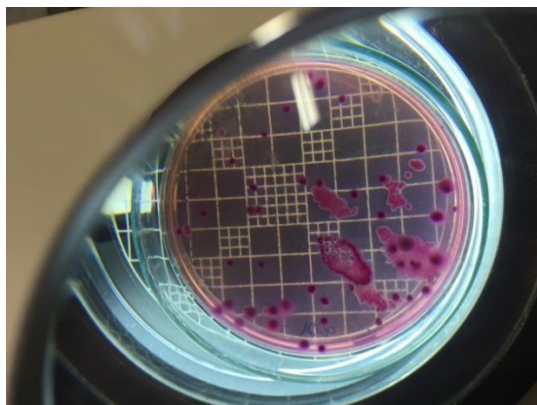


Fig. 2 Colônias características de Enterobactérias em meio VRBG

4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Para a estatística dos dados bacteriológicos foi utilizado o Teste T de Student, com nível de significância a 5% ($p < 0,05$), para todos os cálculos foi utilizado o programa Bioestat versão 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão descritos os resultados das análises da qualidade inicial do “Carpaccio” de carne bovina, das análises bacteriológicas, bem como a discussão destes resultados e a relação dos mesmos com a validade comercial do “Carpaccio” de carne bovina nos quatro tipos de tratamento.

5.1 ANÁLISES DA QUALIDADE INICIAL DO “CARPACCIO” DE CARNE BOVINA

Os resultados das análises bacteriológicas das fatias de “Carpaccio” utilizadas no experimento encontraram-se em conformidade com os padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação nacional (BRASIL, 2001). Tendo em vista este aspecto, foi possível a realização deste experimento.

Não foi encontrada *Salmonella* spp. em nenhuma das quatro amostras selecionadas no preparo das unidades amostrais. A bacteriocina Nisina adicionada aos tratamentos tampouco apresentou contaminação

5.2. CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS E MESÓFILAS.

Os resultados das Contagens de Bactérias Heterotróficas Aeróbias e Mesófilas (CBHAM) durante o período de estocagem podem ser evidenciados na tabela 1 sendo o crescimento bacteriano representado graficamente na figura 3.

Tabela 1. Valores em \log_{10} UFC/g de CBHAM nas amostras Controle e nos 3 tratamentos: Vácuo, Vácuo + Nisina e Nisina.

Dias	Controle	Vácuo	Vácuo + Nisina	Nisina
8	2.47	2.04	2,27	2,27
11	5.11	4.17	4,0	4,07
13	5.04	4.447	4,04	4,80
15	6	4.748	5,8	6,70
20	6,7	6,187	5,505	5,60
28	6,5	6,826	5,79	5,00
32	6,9	6,07	6,63	6,00
34	7,60	6,772	6,04	6
38	7,40	8,3	6,62	6.698
40	9,00	8,00	8,02	8,6

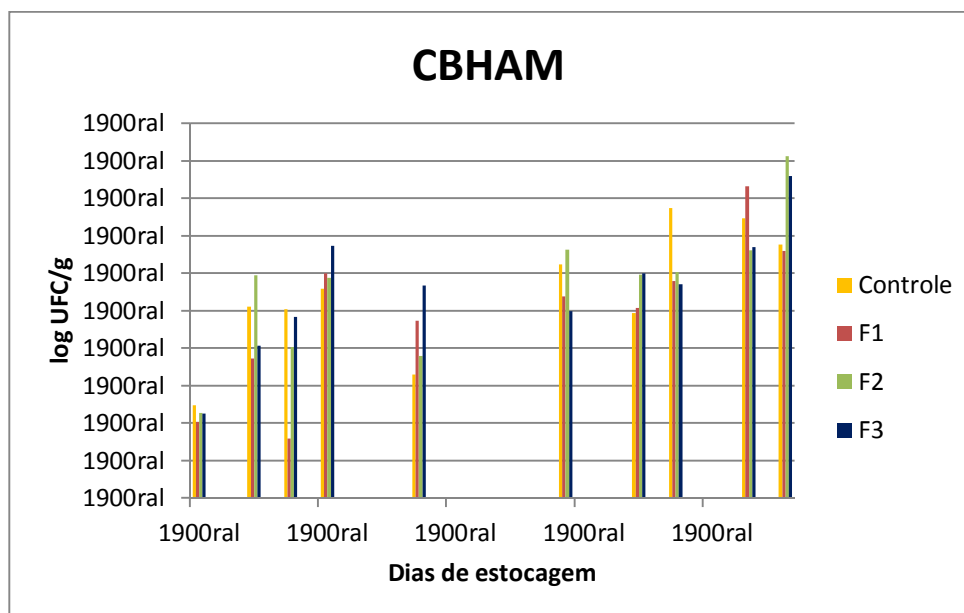


Fig.3. Comportamento das amostras experimentais em relação à contagem de CBHAM durante estocagem. Controle (sem aditivo); F1 (vácuo); F2 (vácuo + Nisina); F3 (Nisina).

Na contagem inicial bacteriana para as três formulações foram encontrados valores menores que 5 log UFC/g, não havendo diferença estatística entre as formulações. A partir do 13 dias de estocagem. Foi observada diferença estatística nas amostras, sendo a amostra Controle a com maiores médias para CBHAM.

Apesar da ausência de um padrão máximo de contagens de CBHAM e CBHAP estabelecidos na legislação brasileira, existem especificações relativas à contagem máxima a nível internacional, padronizada pela “International Commission on Microbiological Specification for Foods” (ICMSF, 1988), que utiliza como referência limite o valor de 7,00 log UFC/g. Desta forma, utilizando este parâmetro a Amostra Controle atingiu o limite aceitável aos 34 dias de armazenamento, seguida da Amostra Vácuo aos 38 dias, as amostras Vácuo com Nisina e Nisina atingiram o limite de deterioração aos 40 dias de tratamento, corroborando com os achados de DELVES-BROUGHTON, (2005). onde o autor avaliou o efeito de salsichas embaladas a vácuo sob refrigeração a que foram adicionados 6,25 mg de Nisina, constatando aumento da validade comercial de 28 para 35 dias, destas salsichas quando comparadas a amostra Controle. Estes resultados diferem de Wang (2000), que não evidenciou diferença estatística entre linguiças tratadas com Nisina e sem Nisina (Controle).

5.2.1 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias e Psicrotróficas

A representação da Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrotróficas (CBHAP) durante o período de estocagem pode ser evidenciada na tabela 2, sendo o crescimento bacteriano representado graficamente na figura 4.

Tabela 2. Valores em \log_{10} UFC/g de CBHAP nas amostras Controle e nos 3 tratamentos: Vácuo, Vácuo + Nisina e Nisina.

Dias	Controle	Vácuo	Vácuo + Nisina	Nisina
8	5,13	2,68	0	2,27
11	4,17	4,17	0	3,51
13	4,44	4,44	5,11	3,51
15	4,9	4,74	5,04	6,74
20	6,25	6,18	5,5	5,65
28	6,25	6,82	6,00	6,11
32	6,46	6,98	6,04	6
34	7,6	9,86	7,41	7
38	7,2	6,77	6,77	6,69
40	8,2	8,04	8,11	6,00

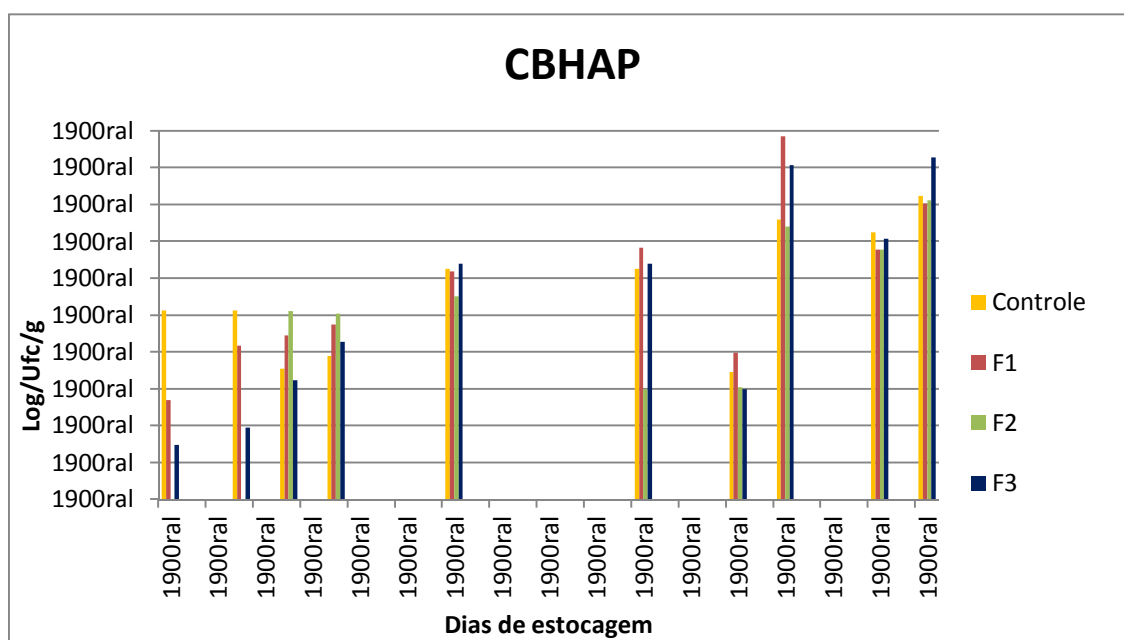


Fig.4: Comportamento das amostras experimentais em relação à contagem de Psicotróficas durante a estocagem: Controle (sem aditivo) F1 (Vácuo) F2 (Vácuo + Nisina); F3 (Nisina).

A contagem inicial para bactérias heterotróficas aeróbias psicotróficas foi maior na amostra Controle quando comparada as bactérias mesófilas, contudo nas amostras do tratamento F2 (Vácuo com Nisina), só houve crescimento a partir do 11º dia de

armazenamento, ficando claro o efeito positivo inicial e uma menor taxa metabólica dessas bactérias que crescem à temperatura de refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$).

Nos quatro tratamentos não se evidenciou diferença estatística entre o 8° e 40° dia de estocagem. O valor de $7 \log_{10}\text{UFC/g}$ foi alcançado pelas 4 amostras no 34° dia de estocagem. Estes resultados corroboram com o descrito por De Martinis; Alves e Franco (2002) que descreveram sobre a limitação do uso de Nisina devido a sua baixa solubilidade e interação com componentes do alimento, não sendo eficiente contra bactérias patogênicas e/ou deteriorantes em carne crua independente da temperatura utilizada.

5.2.2 Contagem de Enterobactérias

A representação da contagem de Enterobactérias durante o período de estocagem pode ser evidenciada na tabela 3, sendo o crescimento bacteriano representado graficamente na figura 5.

Tabela 3. Valores em \log_{10} UFC/g de VRBG nas amostras Controle e nos 3 tratamentos: Vácuo, Vácuo + Nisina e Nisina.

Dias	Controle	Vácuo	Vácuo+Nisina	Nisina
8	2,47	2,04	2,27	2,27
11	5,11	4,17	4,09	4,07
13	5,04	4,44	4,04	4,8
15	6,00	4,74	5,8	6,7
20	6,70	6,18	5,50	5,6
28	6,50	6,82	5,79	5,00
32	6,90	6,07	6,63	6,00
34	7,60	6,77	6,04	6,00
38	7,40	8,30	6,623	6,69
40	9,00	8,00	8,2	8,60

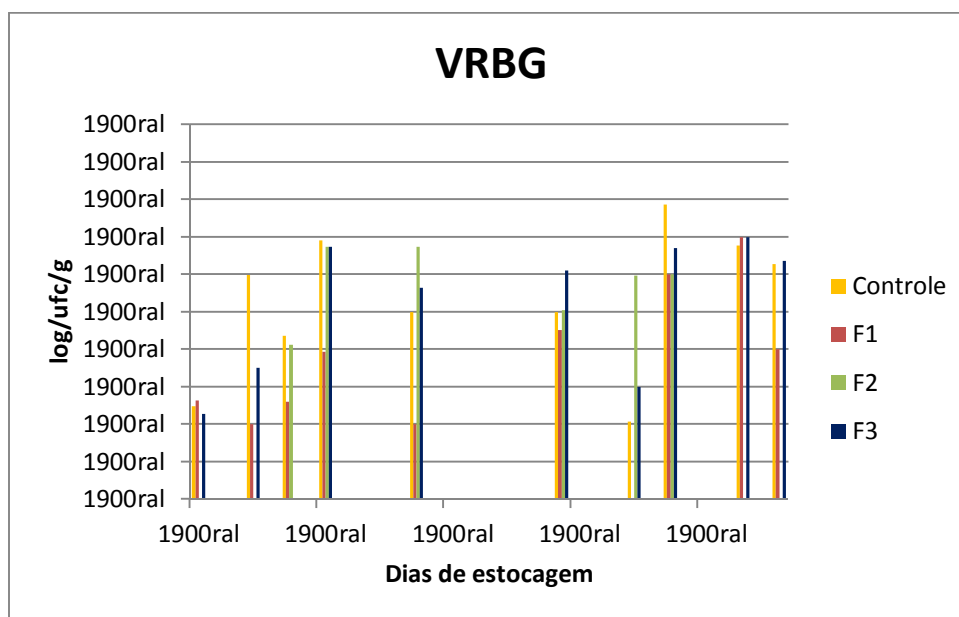


Fig.5: Comportamento das amostras experimentais em relação à contagem de Enterobactérias durante a estocagem: Controle (sem aditivo) F1 (Vácuo); F2 (Vácuo + Nisina); F3 (Nisina).

Na legislação brasileira não consta limite para contagem de *Enterobacteriaceae* em carnes, porém essas análises são importantes uma vez que são indicativas do estado higiênico-sanitário das amostras. Além disso, estas bactérias podem estar envolvidas no processo de deterioração dos alimentos. Entre as amostras observadas houve diferença estatística em todas as formulações durante o período de estocagem. Porém, nas amostras do tratamento Vácuo com Nisina foram observadas cargas bacterianas menores, só iniciando o crescimento a partir do 11º dia de análise, além de alcançar a contagem de $7 \log_{10}$ UFC apenas no 38º dia, enquanto que a amostra Controle atingiu este limite mais precocemente - aos 34 dias de tratamento – observando-se o efeito positivo do tratamento Vácuo com Nisina sobre estas bactérias. Estes resultados diferiram de Papadopoulos et al; (2003), que não encontrou efeito positivo das bacteriocinas sobre estes microrganismos.

5.2.3 Contagem de Bactérias Ácido Lácticas (BAL)

A representação da contagem de Bactérias Ácido Lácticas durante o período de estocagem pode ser evidenciada na tabela 4, sendo o crescimento bacteriano representado graficamente na figura 6.

Tabela 4. Valores em \log_{10} UFC/g de BAL nas amostras Controle e nos três tratamentos vácuo, vácuo + Nisina e Nisina

Dias	Controle	Vácuo	Vácuo + Nisina	Nisina
8	2,11	2,00	2,00	2,25
11	2,63	3,17	3,14	3,38
13	4,49	5,55	4,36	3,47
15	5,9	5,44	5,74	5,74
20	6,94	3,3	5,17	4,49
28	6,94	6,17	6,17	8,17
32	4,49	4,86	4,04	8,16
34	7,9	7,8	7,00	9,00
38	5,84	4,86	6,66	6,6
40	8,78	6,79	6,62	5,41

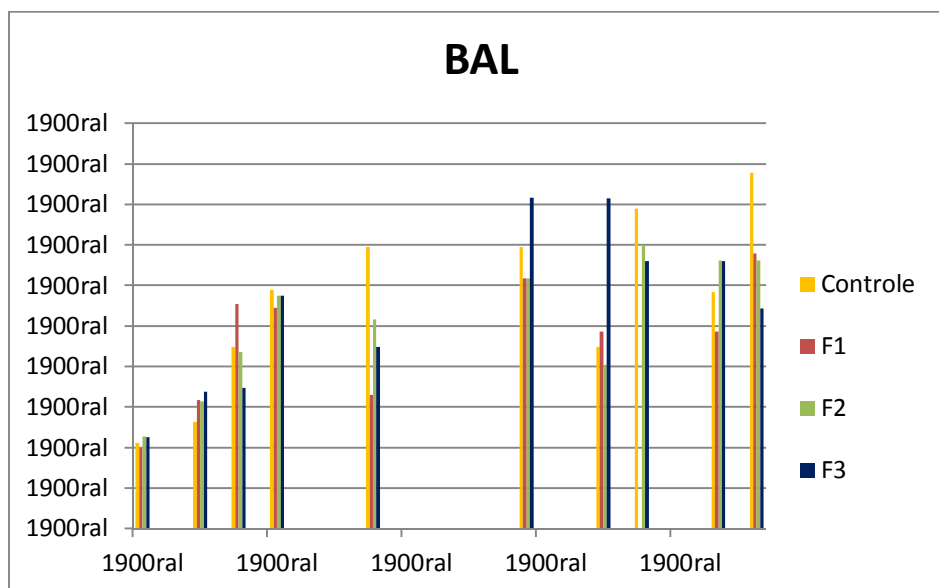


Fig.6: Comportamento das amostras experimentais em relação à contagem de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) durante a estocagem: Controle (sem aditivo) F1 (Vácuo); F2 (Vácuo + Nisina); Nisina.

A representação da contagem de Bactérias Ácido Lácticas durante o período de estocagem pode ser evidenciada na tabela 4, sendo o crescimento bacteriano representado graficamente na figura 12. O crescimento de Bactérias Ácido Lácticas no tratamento F2 (vácuo) e F3(Vácuo + Nisina) foi inicialmente menor em relação aos

outros tratamentos. Isto pode ser explicado por essas bactérias não estarem adaptadas ao meio, provavelmente em função da presença de oxigênio residual na embalagem a vácuo. As Bactérias Ácido Lácticas predominam no processo de deterioração de produtos cárneos estocados sob refrigeração e em condições de anaerobiose corroborando com Nicolai (1993); Veirmerem (2004). Observou-se que as BAL participaram ativamente na deterioração da amostra F3 (Nisina) e Controle visto que aos 28 dias de estocagem atingiu valores acima do limite de $7\log_{10}$ UFC/g. As amostras dos tratamentos Vácuo (F1), Vácuo com Nisina (F2) atingiram a validade comercial de 34 dias para estes microrganismos. Não foram encontradas diferenças estatísticas em nenhum dos tempos de tratamento. No tratamento Nisina observou-se menores efeitos se comparados aos tratamentos Vácuo e Vácuo com Nisina, além de ter deterioração mais rápida que nos demais tratamentos, corroborando com o descrito por Castro (2002) ao observar que no tratamento isolado com Nisina não verificou redução significativa na população de Bactérias Ácido Lácticas independentemente da temperatura utilizada.

6 CONCLUSÕES

Segundo os resultados obtidos neste experimento, foi possível concluir que:

O tratamento vácuo, mesmo sendo bastante eficaz no controle de microrganismos, mostrou-se potencializado quando a bacteriocina foi adicionada, promovendo desaceleração da degradação da Nisina, aumentando assim a qualidade microbiológica e validade comercial do produto.

Com relação às contagens microbiológicas para os quatro microrganismos estudados - Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas e Psicotróficas, Bactérias Ácido Lácticas e Enterobactérias - nos alimentos tratados isoladamente com a bacteriocina Nisina não se verificou aumento da Validade Comercial - evidenciando comportamento similar a amostra Controle (sem aditivo).

Sob o ponto de vista bacteriológico, o tratamento Vácuo 50/50 CO₂ acrescido de 0,5% de Nisina (F3) foi responsável pelos melhores resultados, aumentando em pelo menos seis dias a validade comercial da amostra quando comparado aos demais tratamentos.

7 SUGESTÕES

Sugerem-se mais estudos para avaliação sensorial do “Carpaccio” de carne bovina, visto que o sinergismo de técnicas, para ser benéfico, deve manter as características físicas do produto, garantindo aos consumidores, qualidade microbiológica sem perda de características sensoriais igualmente importantes.

Visto que ainda existem poucos trabalhos referentes à validade comercial em matrizes de carne crua, sugerem-se mais trabalhos no que concerne este assunto.

Como na legislação atual, só constam limites para a utilização da Nisina em produtos lácteos, sugere-se a definição de um padrão adequado para o uso da Nisina em carne crua, já que o sinergismo entre a bacteriocina e a embalagem a vácuo mostrou-se eficiente na preservação do alimento.

Sugere-se que a legislação atual estabeleça limites para a quantidade de Bactérias Heterotróficas Aeróbias e Mesófilas, Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrotóticas, Bactérias Lácticas e Enterobactérias em alimentos, porque essa microbiota participa ativamente na deterioração do produto.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, L. PICARIELLO, G.; SESMA, F.; MORERO, R.D.; BELLOMIO, A. A new hibrid bacteriocin, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram positive and Gram negative bacteria. *The Federation of European Biochemical societies open bio*, n.2, p.12-19, 2012.

AGRAWAL, R; DHARMESH, S. An Anti Shigella dysenteriae bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* MTCC 5151 cheese isolate. *Turkysh Journal of Biology*, v.36,p. 177-185, 2012

AL-JASSER, M.S. *Effect of cooling and freezing temperature on microbial and chemical properties of chicken meat during storage. Journal of Food Agriculture and environment*, v. 10, n.1, p. 113-116,2012.

ANANOU, S.; MAQUEDA, M.; MARTINEZ-BUENO, M.; VALDIVIA, E. Biopreservation, ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*,v. 1. p. 475-486, 2007.

BARROS, J.R; KUNIGKII, L.; JURKIEWICZ, C. H. Incorporation of Nisin in natural casing for the control of spoilage in microorganisms vacuum packaged sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 4, 2010.

BERNARDES, E. Os limites do crescimento. *Revista Nacional da Carne São Paulo*. 34, n.396, p.52-55, fev. 2010

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216, de 15 de Setembro de 2004. Aprova o regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, Distrito Federal, n. 7, p. 4553. 15 setembro de 2004 Seção 1 pé. 1.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 12 de 2 de Janeiro de 2001.Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, D.F., p. 45-53, 10 jan. 2001.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial[da] União*. Brasília, Distrito Federal, p.14,18 de setembro de 2003.

BORCH, E.; MUEMAN, M.L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of food microbiology*, v.33,p.103-120,1996.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. *Bergey's Manual of Systematic Microbiology*. 2. ed. New York: Springer Science + Business Media Inc. 2005. Vol. 2. p. 587-607.

BRESSAN, M.C.; LODI, F.; FERREIRA, M. W.; ANDRADE, P. L.; BOARI, C. A.; PICOLLI, R. H. Influência da embalagem na vida útil de presuntos fatiados. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31, n.2, p. 433-438, 2007.

BRIGHTWELL, G.; CLEMENS, R.; URLICH, S.; BOEREMA, J. Possible involvement of psychotolerant *Enterobacteriaceae* in blown pack spoilage of vacuum packaged raw meats. *Food Microbiology*. v. 26 n. 3, p.283-288, 2007.

CARDOSO, A.L.S.P. CASTRO, A.G.M. TESSARI, E. N. C. BALDASSI, L.; PINHEIRO, E. S. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais. Coliformes fecais, mesófilos em carcaças e cortes de frango. *Higiene Alimentar*. v. 19, n. 128, p. 144-150, 2005.

CASTELLANO, P. BELFIORE, C. FADDA, S. VIGNOLO, G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, v. 79, n. 3, p. 483-499, 2005.

CASTRO, A. P. *Sobrevivência de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, bactérias lácticas e Listeria monocytogenes em salsichas submetidas a tratamento com Nisina*. São Paulo 2002, 91 p. Dissertação (Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, São Paulo, 2002.

CHAVANT, P.; GAILLARD-MARTINIE, B.; TALON, R.; HEBRAUD M.; BERNARDI, T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. Amsterdam, v. 68, n. 3 p. 605-612, 2007.

CLEVELAND, J.; MAINTIVILLE, T. J.; NESS, I.F.; CHIKNIDS, M.L. Bacteriocins safe antimicrobials for food preservation. *International Journal of food Microbiology*. v. 71, p.1-20, 2001.

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

COTTER, P.D.; HILL, C. ROSS, R. P. Bacteriocins: A viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, v.11, p.95-105,2013.

DAINTY, R. H.; MACKEY, B. M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 73, p. 1035-1145, 1992.

DEEGAN, L. H.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, v. 16 p. 1058-1071, 2006.

DI GIACOMO, R. F.; KOEPEL, T.D. Sampling for detection of Infection or Disease in Populations. *Journal American of Veterinary Research*, v. 20, p. 176-179, 1986

DELBONI, R. *Dinâmica populacional de microrganismos e a conservação de alimentos*. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual de Campinas, 2009.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin as a food preservative. *Food Australia*, v. 57, n. 12, p. 525-527, dez., 2005.

DELVES, BROUGHTON, J. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Australia*, v. 57, p. 525-527,1990.

DE. MARCHI, P. G. F.; JUNIOR, O. D. R.; CERESER, N. D. C.; DE SOUZA, V.; REZENDE-LAGO, N. C. M., DE FARIA, A. A. Avaliação Microbiológica e Físico Química da carne bovina moída comercializada em supermercados de Jaboticabal, São Paulo. *Revista eletrônica da Univar*, n. 7, p. 81-87, 2012.

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

ERCOLINI, D.; FERROCINO, I.; LA STORIA, A.; MAURIELLO, G.; GIGLI, S.; MASI, P.; VILLANI, F. Development of spoilage microbiota in beef stored in Nisin activated packaging. *Food Microbiology*, v. 27, n. 1, p. 137–143, fev., 2010.

ERCOLINI, D. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 72, n. 7, p. 4663-4771, Julho, 2006.

ETTAYEBI, K.; YAMANI, J. E.; ROSSI-HASSANI, B. D. Synergistic effect of nisin and thimol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiologic Letters*, v. 183, p.191-195, 2000.

EVANGELISTA, J. *Tecnologia dos Alimentos*. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.p.

FERIA CACERES, P. F. *Aislamiento y caracterizacion Bacteriocinas producidas por Lactobacillus plantarum, LPBM10 em suero de leche*. Medellín, Colombia, 2007. 84f Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Faculdade de Ciências. Universidade Nacional de Colômbia, Medellín, Colômbia, 2007.

FELIPE, L. M. *Associação de bactérias da família Enterobacteriaceae e Clostridium esterterthicum com a deterioração “blownpack” em cortes cárneos embalados a vácuo*. Jaboticabal, 2008. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed 182 p. 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. 355 p.

FRANCO, R. M. *Agentes etiológicos de doenças alimentares*. Niterói: Editora da UFF, 2012, 120 p.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M.A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, n. 4, p. 591-606, 2008.

GOTTARDI, C.P.T. *Avaliação das condições higiênico-sanitárias do ambiente de manipulação de produtos fatiados de origem animal de redes de supermercado de Porto Alegre*, 2006.79f. (Dissertação Mestrado em Ciências Veterinárias na área de

Segurança dos Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

HALL, P. A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R. S. Acid-producing microorganisms. In: OWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4. ed. Washington, D.C.: American Public Health Association. 2001. cap. 19, p. 201-207.

HERNANDEZ-MACEDO, M.; BARANCELLI, G. V.; CONTRERAS-CASTILLO, C. Microbial deterioration of vacuum packaged chilled beef cuts and techniques for microbiota detection and characterization: a review. *Brazilian Journal of Food Microbiology*, v. 42, n.1, p.1- 11, Jan. 2011.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN.; BJORKROTH, J.; SHILLINGER. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, n.73, p. 356-373. 2001.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, v. 49. p. S139-S150, 1998.

HURST, A. Nisin. *Advanced Applied Microbiology*, v.27, p.85-123, 1981.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Microorganisms in Food*. 2 - Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. 2 ed. Toronto: University of Toronto Press, 1988.

JAY J.M.L. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2010, 711p.

JULIÃO, A. M.; COSTA, P. S. Avaliação microbiológica e controle da produção de carne resfriada homogeneizada de bovino preparada em nível varejista no Estado do Rio de Janeiro. *Higiene Alimentar*, v. 16, n. 96, p. 94-99, 2002.

KAALE, L.D. Superchilling of Food: A review. *Journal of Food Engineering*, v. 107, n.2 p.141-146, 2011.

KAUR, G.; MALIK, R.K.; MISHRA, S.K.; SINGH, T.; BHARDWAJ ,A.; SINGROHA, G.; VIJ, S.; KUMAR, N. Nisin and class II bacteriocin resistance among

Listeria monocytogenes and other foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Microbial drug resistance*, v.17, n.2 2011.

KLAENHAMMER, T .R. Genetics of bacteriocins produced by acid lactic bacteria. *FEMS Microbiology Rev.* v. 12, n. 3, p. 39-85, 1993.

KOUSTIOKOVICH, E. *Why Italians love to talk about food*. New York: Editora MacMillan, 2009, 449 p.

KOUTSOUMANIS, K.P.; TAOUKIS,P. Meat safety refrigerated storage and treatment modeling and management. In: _____ Improving the safe of fresh meat, 2ed. 2005, p.503-561.

KORNAKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae, coliforms and Escherichia coli as quality and safety indicators*. In: _____ Compendium of methods for the microbiological examination of foods 4 ed. Washington: American Public Health Association,2001,676 p. cap.8,p. 69-82

LEROY, F.; DE VUYST, L. (2004).Lactic Acid Bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science Technology*, p.67-78, 2004

LUCQUIN, I.; ZAGOREC, M.; CHAMPOMIER-VERGÈS, M.; CHAILLOU, S. Fingerprint of lactic acid bacteria population in beef carpaccio is influenced by storage process and seasonal changes. *Food Microbiology*, v. 29, p. 187-196, 2012.

LUNDGREN, P. U.; SILVA, J. A. da.; MACIEL, J. F; FERNANDES, T. M. Perfil da qualidade higiênico sanitária da carne bovina comercializada em feiras livres e mercados públicos de João Pessoa/PB-Brasil. *Alimentos e Nutrição*, v. 20, p. 113-119, jan/mar.; 2009.

MC AULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynhthesis and mode of action. *FEMS, Microbiology reviews* v. 35, p. 285-308, 2001.

MADIGAN,M.T. *Microbiologia de brock* 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARTIN, S.W.; MEEK, A.H.; WILLERBERG, P. *Veterinary Epidemiology-Principles and Methods*. Iowa State University Press: Anes, Iowa, 1987. 343p.

MIDURA, T.F.; BRYANT,R.G.Sampling Plans, sample collection, shipment and preparation for analysis. In Downes, F.P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the*

Microbiological Examination of Foods. 4 ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

MOLLOY, EM.; FIELD, D.; O'CONNOR, PM; COTTER, PD; HILL, C; ROSS. Saturation Mutagenesis of Lysine 12 Leads to the identification of derivatives of Nisin A Enhanced Antimicrobial Activit. *Plus One* v. 8 n.3, p. 53-58, 2014.

MORTON, R. D.; Aerobic plate count. In: Dowens, F. P.; ITO, K. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001, p. 63-67, 2001.

MOTTA, M. R. A.; BELMONTE, M. A. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializada em supermercados da região oeste de São Paulo. *Higiene Alimentar*, v. 14, n. 78-79, p. 59-62, 2000.

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

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

ORDONEZ, J.A. *Tecnologia de alimentos-volume II: alimentos de origem animal*. Trad. Fátima Murad. Porto Alegre: Artmed. 2005. 279 p. Tradução de: tecnologia de los Alimentos-volume II, alimentos de origen animal.

PAPADOPOULOS, V.; CHOULIARA, IBADEKA, A.; SAVVAIDIS, I.N.; KONTOMIMA S, M.G. Effect of gutting on microbiological, chemical and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology* v. 20, p. 411-420, 2003

PARADA, J.L.; CARON, C.R.; MEDEIROS, A.B.P.; SOCCOL, C.R. Bacteriocins from acid lactic bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* v. 50 n.3 p.427-431, 2007.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F. dos.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. *Ciência Higiene e Tecnologia da carne* 2 ed. Goiânia: Editora da UFG, 2006, 623 p.

PEIRSON, M.D.; GUAN, T.Y.; HOLLEY, R.A. Aerococci and carnobacteria cause discolouration in cooked cured bologna. *Food Microbiology*, v. 20, p. 149 - 158, 2003.

PENG, J.; TSAI, W. C.; CHOU, C. C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International Journal of food microbiology*, Oxford, v. 77, n.1 p. 11-18, 2002.

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

RAY, B.; BHUNIA, A. *Fundamental food microbiology*, Boca Raton: CRC, 2008, 475 p.

ROBERTSON, G.L. Modified atmosphere packaging. In: Robertson, G.L. Food packaging, principles and practice, 2006. Disponível em <books.google.com.br> Acesso em 5 jan. 2016.

SARANTOPOULOS, S. Embalagens com atmosfera modificada/Controlada. *Revista Nacional da Carne*, São Paulo, n. 209, p. 32-42, 1991.

SARANTOPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; ANJOS, V. D. A. Embalagens para produtos cárneos, *Ciência e Tecnologia*, v. 16, n. 3 p. 202-210, 1994.

SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dados epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2015, 2015. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos_dta_15911.pdf. Acesso em: 5/01/2016.

SINGH, B.; FALAHEE, M. B.; ADAMS, M. R. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. *Food Microbiology*. v. 18, n. 133-139, 2001

SILVA, N.; JUNQUEIRA V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos.; GOMES, R. A. R. *Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos e água*. 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 632.

SILVA, R. X. A.; PIMENTEL, T. J. A.; FRANCO, R. M. *Avaliação do efeito de Lactato de Sódio e Nisina e sua combinação na validade comercial e na caracterização sensorial de linguiça toscana*. Niterói, Brasil, 2008. 87f. Dissertação (Mestrado em

Higiene e Processamento Tecnológico de Alimentos). Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil, 2013.

VASQUEZ, S.M.; SUAREZ, H.; ZAPATA, S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas em la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, v.36, n.1, 2009.

VEIRMEREN, L.; DEVLIEGHRE, F.; DEBEVERE, J. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 96 p. 149-164, 2004.

VIEIRA, C.R.N.; TEIXEIRA, C.G. Condições Higiênico sanitárias de carcaças resfriadas de frango comercializadas em Poços de Calda - MG. *Higiene Alimentar*, v. 11, n. 48, p. 36-40, 1997.

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

WILLIAMS, G.C.DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, v. 2 p. 4128-4135, 2003.

