

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**SELMA EUFRASIO DURANTE DA SILVA**

**BIOFILME COM INCORPORAÇÃO DE NISINA: APLICAÇÃO EM  
SALSICHA**

**MEDIANEIRA**

**2020**

**SELMA EUFRASIO DURANTE DA SILVA**

**BIOFILME COM INCORPORAÇÃO DE NISINA: APLICAÇÃO EM  
SALSICHA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR - Câmpus Medianeira, como um dos requisitos obrigatórios para a obtenção do grau de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Aparecida da Silva Buzanello.

Coorientadora: Profa. Dra. Marinês Paula Corso.

**MEDIANEIRA**

**2020**



---

## TERMO DE APROVAÇÃO

### Título do Trabalho:

Biofilme com Incorporação de Nisina: Aplicação em Salsicha

### Aluna:

Selma Eufrasio Durante da Silva

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado às 19:00 horas do dia 23 de novembro de 2020 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo no Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Medianeira. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Profa. Rosana A. da Silva Buzanello  
UTFPR - Câmpus Medianeira  
(Orientadora)

---

Profa. Marinês Paula Corso  
UTFPR - Câmpus Medianeira  
(Coorientadora)

---

Profa. Denise Pastore de Lima  
UTFPR - Câmpus Medianeira  
(Convidada)

---

Profa. Natara Favaro Tosoni  
UTFPR - Câmpus Medianeira  
(Convidada)

---

Prof. Fábio Avelino Bublitz Ferreira  
UTFPR - Câmpus Medianeira  
(Responsável pelas atividades de TCC)

O termo de aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e forças durante esses anos e conseguir abraçar mais uma conquista tão importante na minha vida.

A minha família, em especial aos meus pais, José e Ester, que com muito carinho me motivaram em cada momento a seguir em frente apesar dos muitos obstáculos que surgiram ao decorrer dessa caminhada.

Ao meu esposo e filho, Valdir e Isaque, que com muita compreensão me apoiaram e entenderam minha ausência durante todo o período, e não mediram esforços para que eu pudesse tornar este sonho realidade.

Agradeço a todos os meus professores da UTFPR – Câmpus Medianeira e em especial à professora orientadora Rosana Aparecida da Silva Buzanello e coorientadora Marinês Paula Corso pelas instruções, compreensão e por terem compartilhado seus conhecimentos durante a realização deste trabalho. Levarei comigo todos os ensinamentos repassados com muito apreço em meu coração.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste projeto.

Finalizo este agradecimento com uma única palavra: Gratidão.

Os sonhos precisam de persistência e coragem para serem realizados. Nós os regamos com nossos erros, fragilidades e dificuldades. Quando lutamos por eles, nem sempre as pessoas que nos rodeiam nos apoiam e nos compreendem. Às vezes somos obrigados a tomar atitudes solitárias, tendo como companheiros apenas nossos próprios sonhos (AUGUSTO CURY).

## RESUMO

Perdas industriais estão associadas a deterioração rápida de salsichas, muitas vezes ocasionada pela contaminação ambiente após o processo de cozimento e descasque. Assim, alternativas que busquem melhorar a conservação dos alimentos devem ser continuamente realizadas, visando a redução de perdas comerciais e possibilitando ao consumidor um alimento seguro por um tempo maior. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um biofilme a base de amido e gelatina, com incorporação de nisina, para aplicação em salsichas e avaliar o seu efeito na vida útil do produto. Neste estudo foram utilizadas salsichas produzidas em frigorífico comercial provenientes de um mesmo lote de produção. O biofilme foi aplicado nas salsichas por meio da imersão, combinado com o acondicionamento à vácuo. Salsichas tratadas (com biofilme) e controle (sem biofilme) foram acondicionadas sob refrigeração e avaliadas durante 42 dias de armazenamento por meio de análises físico-químicas e microbiológicas. A contagem de bactérias lácticas durante o armazenamento das salsichas revelou que o biofilme afetou o crescimento bacteriano até o 35º dia, resultando em contagens cerca de 2 ciclos log inferiores às amostras controle. As salsichas tratadas e controle apresentaram contagens de microrganismos patógenos abaixo dos limites preconizados pela legislação. As salsichas produzidas apresentaram composição centesimal de acordo com o preconizado pela legislação vigente. A aplicação do biofilme contendo nisina não afetou significativamente o teor de amido, o teor de umidade, a luminosidade ( $L^*$ ) e o parâmetro  $b^*$  (tonalidade amarelada) das salsichas ( $p > 0,05$ ). Contudo, os valores do parâmetro  $a^*$  diferiram entre as amostras ( $p \leq 0,05$ ), indicando uma maior tonalidade avermelhada para as salsichas controle, impactando também no valor do parâmetro  $h^\circ$  (hue). O pH das amostras controle foi inferior à amostra tratada no 42º dia de armazenamento ( $p \leq 0,05$ ), sugerindo uma maior produção de ácidos por bactérias deteriorantes ao final da vida útil das salsichas controle. A atividade de água ( $A_w$ ) foi inferior na amostra controle apenas no 14º dia de armazenamento, não diferindo entre as amostras no último dia de armazenamento. Contudo, as amostras tratadas tiveram a redução da  $A_w$  ao longo do armazenamento, possivelmente devido a interações hidrofílicas entre o biofilme e a água da amostra. A força de cisalhamento foi superior nas amostras controle no tempo 0 e no 42º dia de armazenamento, sugerindo maior maciez em salsichas tratadas. Os resultados indicam que o biofilme apresentou efeito protetor nas salsichas até o 35º dia de armazenamento. Contudo, sugere-se a realização de estudos posteriores, variando a concentração de nisina ou a aplicação combinada com outros antimicrobianos para prolongar a vida útil do produto.

**Palavras-chave:** Acondicionamento e Conservação de Alimentos. Amido. Bacteriocinas. Microbiologia Industrial.

## ABSTRACT

Industrial losses are associated with the rapid deterioration of sausages, often caused by environmental contamination after the cooking and peeling process. Thus, alternatives to improve food conservation must be continually conducted, aiming at reducing commercial losses and enabling consumers to have safe food for a longer time. This study aimed to develop a biofilm-based on starch and gelatin, with nisin incorporation, for sausage application and to evaluate its effects on the product's shelf life. In this study, sausages were produced in a commercial slaughter from the same production bath. The biofilm was applied to the sausages by immersion, combined with vacuum packaging. Sausages treated (with biofilm) and control (without biofilm) were stored under refrigeration and were evaluated during 42 days of storage by physicochemical and microbiological analyses. The count of lactic acid bacteria during sausage storage revealed that the biofilm affected the bacterial growth until the 35<sup>th</sup> day, resulting in counts about 2 log cycles lower than those of the control samples. The treated and control sausages had counts of pathogenic microorganisms below the limits recommended by the legislation. The sausages had a proximate composition according to the legislation recommendation. The application of biofilm containing nisin did not significantly affect the starch content, moisture content, luminosity ( $L^*$ ), and the  $b^*$  parameter (yellowness) of the sausages ( $p > 0.05$ ). However, the values of  $a^*$  parameter differed between samples ( $p \leq 0.05$ ), indicating a greater redness for control sausages, also impacting the  $h^\circ$  parameter (hue). The pH of the control samples was lower than the treated sample on the 42<sup>nd</sup> day of storage ( $p \leq 0.05$ ), suggesting a greater production of acids by deteriorating bacteria. The water activity ( $A_w$ ) was lower in the control sample only on the 14<sup>th</sup> day of storage, with no difference between samples on the last day of storage. However, the treated samples had a reduction in  $A_w$  during storage, possibly due to hydrophilic interactions between the biofilm and the sample water. The shear force was higher in the control samples at time 0 and 42 days of storage, suggesting greater softness in treated sausages. The results indicate that the biofilm had a protective effect on sausages until the 35<sup>th</sup> day of storage, however, further studies are suggested, varying the concentration of nisin or the combined application with other antimicrobials to prolong the product's shelf life.

**Keywords:** Food packaging and preservation. Starch. Bacteriocins. Industrial Microbiology.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resultado das determinações microbiológicas de microrganismos patogênicos das amostras de salsicha controle (sem biofilme) e tratada (com aplicação de biofilme) (n = 4) .....	23
<b>Tabela 2.</b> Teor de amido (%), umidade (%) e parâmetros físico-químicos das amostras de salsicha controle (sem biofilme) e tratadas (com aplicação de biofilmes contendo nisina) durante os 42 dias de armazenamento .....	28



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Curva típica do crescimento microbiano (1) e a respectiva curva da velocidade específica de crescimento (2) em relação ao tempo.....	16
<b>Figura 2.</b> Fluxograma do processamento de salsicha.....	18
<b>Figura 3.</b> Determinação da força de cisalhamento (N) utilizando a lâmina Warner-Bratzler (HDP/WB) .....	22
<b>Figura 4.</b> Curva de crescimento de bactérias lácticas durante os 42 dias de armazenamento das salsichas controle (sem biofilme) e tratadas (com aplicação de biofilme contendo nisina) .....	25
<b>Figura 5.</b> Imagens das salsichas tratadas com biofilme contendo nisina (a) e salsichas controle (b), sem biofilme.....	26

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>12</b>
3.1 EMBUTIDOS EMULSIONADOS: SALSICHA .....	12
3.2 BIOFILMES EM ALIMENTOS .....	13
3.3 NISINA .....	14
3.4 CONSERVAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS .....	15
3.5 CRESCIMENTO MICROBIANO .....	16
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
4.1 MATERIAIS .....	18
4.2 MÉTODOS .....	19
4.2.1 Preparo da solução filmogênica de gelatina e amido contendo nisina .....	19
4.2.2 Aplicação do biofilme .....	20
4.2.3 Análises Microbiológicas .....	20
4.2.4 Determinações físico-químicas das salsichas .....	21
4.2.5 Análise dos dados .....	22
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
5.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS .....	23
5.2 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS .....	26
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>32</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No ambiente em que vivemos cada vez mais encontra-se um mercado competitivo, com a necessidade de fornecer produtos diferenciados e de qualidade aos consumidores. Os produtos processados tem sido o alvo de aprimoramento das indústrias e comércio, onde agregam valores econômicos às carnes *in natura*, como a utilização de partes de animais de difícil comercialização e o aumento da vida útil. Esses produtos se caracterizam como produtos mais consumidos devido ao baixo custo, preparo rápido, atendendo a um público variado e tornando acessível por diferentes classes sociais assim como faixa etária também (BRASIL, 2014).

Segundo a Instrução Normativa nº 4 de 2000 “entende-se por salsicha o produto cárneo industrializado, obtido da emulsão de carne de uma ou mais espécies de animais de açougue, adicionados de ingredientes, embutido em envoltório natural, ou artificial ou por processo de extrusão, e submetido a um processo térmico adequado”. Como processos adicionais, as salsichas ainda poderão ser submetidas ao tingimento, depilação, defumação e uso de recheios e molhos (BRASIL, 2000).

Apesar dos métodos de conservação utilizados, inspeção, armazenamento correto e fiscalização criteriosa, produtos emulsionados como a salsicha podem sofrer alterações devido a exposição ao ambiente, depois do choque térmico até a embalagem, ocasionando o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes resultando em perdas para a indústria, assim como a possibilidade de danos à saúde do consumidor (ARAÚJO et al., 2019; CESAR, 2008). O uso de biofilmes tem sido uma possibilidade de conservação para esses alimentos, e associado com o processo a vácuo tornam-se mais eficientes por um período maior. Os biofilmes são obtidos de material biológico biocompatível/biodegradável, tais como polissacarídeos ou proteínas, sendo preparados na forma de uma solução e aplicados por imersão (FAKHOURI et al., 2007).

A aplicação de nisina é uma alternativa para conservação de salsicha, pois possui a habilidade de inibir o crescimento microbiano de bactérias Gram positivas em alimentos, inclusive as patogênicas que causam danos à saúde, como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes*. O seu uso

combinado com outros agentes de conservação mostra-se efetivo sobre bactérias Gram negativas e fungos (PINILLA, 2016).

A incorporação da nisina em biofilmes permite o controle de sua taxa de liberação, melhorando a atuação com uma concentração permanente na superfície do alimento, formando uma barreira protetora e prolongando o tempo de vida útil (GHARSALLAOUI et al., 2016b), podendo ser uma alternativa interessante a aplicação de um biofilme incorporado de nisina no produto salsicha, afim de aumentar sua conservação.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um biofilme a base de amido e gelatina, com incorporação de nisina, para aplicação em salsichas e avaliar o seu efeito na vida útil do produto.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver biofilme a base de amido e gelatina adicionado de nisina.
- Avaliar o efeito da aplicação dos biofilmes nas salsichas, acondicionadas a vácuo e sob refrigeração, nas contagens microbianas durante 42 dias de armazenamento, em comparação a um controle (sem aplicação de biofilme).
- Determinar o conteúdo de amido das salsichas tratadas e não tratadas com biofilme, para atendimento da legislação.
- Avaliar as propriedades físico-químicas das salsichas em termos de cor, pH, força de cisalhamento, bem como, o teor de umidade, ao longo do período de armazenamento.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 EMBUTIDOS EMULSIONADOS: SALSICHA

Os produtos cárneos emulsionados são responsáveis por agregar valor às porções de carne comercializadas *in natura* e acrescentar opções de escolha aos consumidores. As salsichas e mortadelas são os produtos emulsionados mais populares dentre os consumidores e, devido ao seu baixo custo, fácil preparo e por serem apreciados por consumidores de diferentes faixas etárias, caracterizam-se como produtos amplamente consumidos (GORDON; BARBUT, 1992).

O processo tecnológico para elaboração de salsicha consiste na separação e moagem das matérias-primas cárneas seguido do encaminhamento à misturadeira, local onde serão incorporados os demais ingredientes não cárneos, tais como, condimentos, água (gelo), gordura, fosfatos, sal, sais de cura, antioxidante, amido e proteínas não cárneas, obtendo-se uma emulsão. Após, a emulsão cárnea é refinada, embutida em envoltório artificial e direcionada à etapa de cozimento. O processo de cozimento geralmente ocorre em estufas com tempo e temperatura controladas, sendo cozidas até o atingimento da temperatura interna de 72 °C para garantia da segurança microbiológica. Após o cozimento, realiza-se a etapa de choque térmico até as salsichas atingirem a temperatura ambiente (25 °C), seguidas então, para a depilação e tingimento com solução ácida de urucum, seguindo para a etapa de acondicionamento e resfriamento.

Apesar do controle do processo de fabricação e o uso de aditivos tecnológicos adequados, os produtos cárneos emulsionados como salsichas estão sujeitos a sofrerem contaminação microbiana, muitas vezes associada ao processo de manipulação após o cozimento, reduzindo sua vida útil, além da possibilidade de acarretar danos à saúde do consumidor (ARAÚJO et al., 2019; CESAR, 2008). Sendo assim, alternativas que viabilizem o aumento da vida útil destes produtos são desejáveis.

### 3.2 BIOFILMES EM ALIMENTOS

Uma das técnicas mais utilizadas para auxiliar na preservação de produtos cárneos consiste no acondicionamento a vácuo. A remoção do oxigênio permite prolongar a vida útil dos produtos, evitando que bactérias aeróbias se desenvolvam, sendo estas as principais causadoras da deterioração dos produtos (SOUZA, 2018). No entanto, uma pequena quantidade de oxigênio (~1%) pode permanecer na embalagem de produtos acondicionados a vácuo, uma vez que o processo de exclusão de oxigênio não é completamente eficiente. Assim, alterações nas propriedades sensoriais do produto, tais como sabor, cor, textura e aroma podem ocorrer em função do crescimento de micro-organismos aeróbios estritos ou facultativos (ENGEL et al., 2016). Desta forma, a utilização de biofilmes pode ser uma alternativa viável para a preservação de produtos acondicionados a vácuo por um período maior.

Os biofilmes consistem em uma camada de cobertura fina elaborados através de material biológico biocompatível/biodegradável, tais como polissacarídeos ou proteínas, aplicados diretamente na superfície do produto ou imergindo-o em uma solução. Estes filmes possuem a função de reduzir o deslocamento de umidade, oxigênio, dióxido de carbono, aromas, dentre outros, promovendo uma barreira de proteção ao produto. Para elaboração de filmes e coberturas comestíveis podem ser utilizadas proteínas (gelatina, caseína, ovoalbumina, glúten de trigo, zeína e proteínas miofibrilares), polissacarídeos (amido e seus derivados, pectina, celulose e seus derivados, alginato e carragena) e lipídios (monoglicerídeos acetilados, ácido esteárico, ceras e ésteres de ácido graxo) ou, ainda, utilizar combinações entre eles, tendo como benefício agregar os pontos positivos desses constituintes. Portanto, é de extrema importância que esses filmes e coberturas comestíveis tenham suas propriedades sensoriais neutras (transparente, inodoro e insípido), não alterando a qualidade do produto prolongando a vida útil (FAKHOURI et al., 2007).

Biofilmes produzidos a base de polissacarídeos ou proteínas apresentam adequadas propriedades ópticas e mecânicas, contudo, apresentam sensibilidade à umidade e alta capacidade de absorção de água. Enquanto que filmes a base de lipídios são pouco flexíveis, opacos, mas com boas propriedades de barreira de vapor de água (GALLO et al., 2000).

A tentativa de explicar, compreender e controlar os mecanismos de transferência de compostos do material polimérico para a superfície do produto revestido tem despertado o interesse no estudo da tecnologia de biofilmes antimicrobianos. Em virtude de que, na maioria dos alimentos, sejam eles sólidos ou semissólidos, o processo de crescimento microbiano ocorre na superfície, surge a possibilidade da utilização de menor quantidade de conservantes químicos em relação ao que se usa quando adicionados diretamente ao produto (NETO, 2009).

### 3.3 NISINA

A nisina é uma bacteriocina de natureza proteica, produzida por bactérias, que apresenta propriedades bactericidas ou bacteriostáticas. É um polipeptídeo constituído de 34 aminoácidos e produzido através de fermentação da sacarose pela bactéria *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. É ativa contra bactérias gram-positivas e apresenta pouca atuação contra as bactérias gram-negativas, leveduras ou fungos. Porém, seu uso em combinação com outros mecanismos de conservação tem sido relatado como alternativa para reduzir a resistência de algumas espécies à nisina, bem como, ampliar sua atividade inibitória também para espécies gram-negativas (PINILLA, 2016).

O mecanismo de ação da nisina consiste na sua adsorção na superfície da célula alvo e posterior desestabilização da estrutura da membrana citoplasmática. A sua adsorção está associada a interações eletrostáticas entre a nisina, com uma carga líquida positiva, e os fosfolipídios da membrana celular, que apresentam uma carga líquida negativa. A eficácia dessa interação depende da natureza e do conteúdo dos fosfolipídios da membrana celular, o que pode explicar as diferenças de sensibilidade entre as diferentes espécies bacterianas. A liberação dos componentes essenciais do citoplasma e/ou a ruptura celular resulta na morte celular da bactéria (GHARSALLAOUI et al., 2016a).

A nisina tem atividade comprovada contra diferentes espécies, incluindo *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Listeria* e *Micobacterium*, células vegetativas e esporos de *Bacillus* e *Clostridium*, o que demonstra a possibilidade de aplicações nas mais diferentes matrizes alimentares, uma vez que é reconhecida como ingrediente seguro (GRAS, do inglês *Generally Recognized As Safe*) desde 1988. Estudos relatados avaliaram eficácia da nisina sobre patógenos na inibição do crescimento microbiano em queijos, salsichas, produtos enlatados, cerveja e derivados lácteos. A nisina é uma



bacteriocina dependente do pH, de modo que condições de pH menores possibilitam sua maior ativação. Além disso, as condições de temperatura e a natureza do substrato também podem afetar sua atividade biológica, devido a sua solubilidade e estabilidade serem afetadas (SINGH, 2018).

A aplicação de nisina em biofilmes poliméricos caracteriza-se como uma alternativa para melhorar sua atuação, uma vez que o envolvimento da nisina em uma matriz polimérica permite uma barreira de difusão para limitar e controlar a taxa de liberação e para garantir uma concentração constante de nisina na superfície do alimento. Atualmente, as tendências gerais de pesquisa no campo das embalagens antimicrobianas visam associar características antimicrobianas e biodegradáveis (GHARSALLAOUI et al., 2016b).

### 3.4 CONSERVAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS

Devido a perecibilidade, a carne e os produtos cárneos tem sua vida útil extremamente dependente do número e do tipo de bactéria inicialmente presente, bem como, do seu crescimento nas condições aplicadas durante o armazenamento (GEITENES et al., 2013).

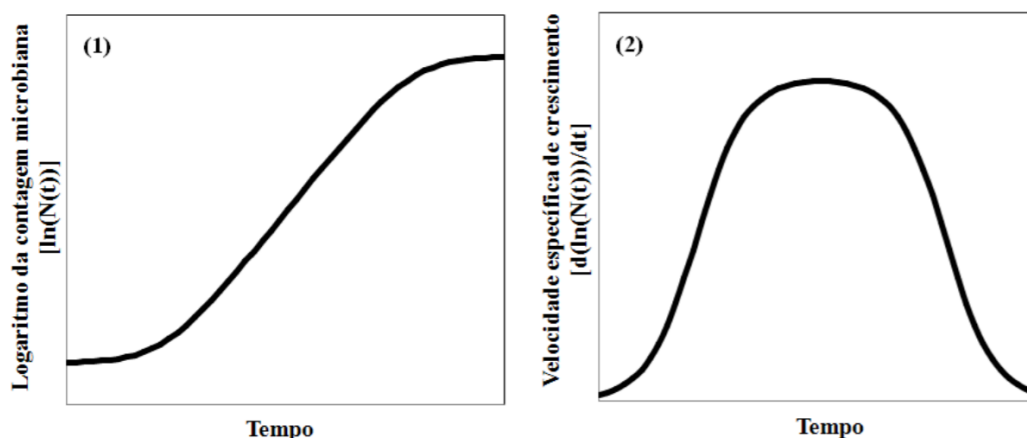
Para garantir a vida útil dos alimentos e a sua segurança microbiológica, deve-se reduzir níveis de contaminação, limitando ou impedindo a taxa de crescimento microbiano sendo a temperatura um fator essencial para assegurar a vida útil dos alimentos (McMEEKIN et al, 1997).

A conservação de alimentos ocorre através de processos que adiam ou previnem as reações físico-químicas, bioquímicas e microbiológicas, responsáveis pela degradação e alterações dos mesmos. Alguns exemplos utilizados são a redução de atividade de água (concentração, secagem e desidratação) e uso de frio (resfriamento e congelamento), reduzindo a velocidade das reações, aplicação de calor (tratamentos térmicos como pasteurização e esterilização), inativando os microrganismos e enzimas que deterioram o alimento, e redução de pH (acidificação) seguida de tratamento térmico, limitando o crescimento de microrganismos (FELLOWS, 2006). O uso destes métodos associados a utilização de biofilmes com incorporação de nisina, por exemplo, pode ser sugerida para prolongar a vida útil destes produtos, trazendo benefícios significativos para a indústria.

A embalagem se torna um fator importante para manter a qualidade inicial de carnes e derivados, durante o período de estocagem. Essa embalagem cria uma barreira a gás, alterando a atmosfera gasosa ao redor da superfície do produto. O oxigênio que resta no interior da embalagem é consumido pela atividade metabólica da carne e das bactérias onde resulta em uma vida útil mais longa comparada ao de produtos expostos ao ar, se torna ainda mais efetivo se a estocagem for realizada na faixa de  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $3\text{ }^{\circ}\text{C}$  (SARANTÓPOULOS; OLIVEIRA, 1994).

### 3.5 CRESCIMENTO MICROBIANO

O crescimento microbiano apresenta fases distintas. A velocidade específica do crescimento na fase inicial apresenta um valor próximo a zero e, em seguida, aumenta gradativamente para um valor máximo com o decorrer do tempo. Esta velocidade decresce gradativamente até aproximar-se de zero, etapa em que um valor assintótico no crescimento microbiano é alcançado. A representação do crescimento microbiano por meio do seu logaritmo em função do tempo resulta em uma curva sigmoideal (Figura 1) (LONGHI, 2012).



**Figura 1.** Curva típica do crescimento microbiano (1) e a respectiva curva da velocidade específica de crescimento (2) em relação ao tempo.

Fonte: Adaptado de Longhi (2012).

A fase *lag* caracteriza-se como o período de adaptação microbiana não havendo aumento da população. A vida útil dos alimentos pode estar relacionada a duração da fase *lag*, uma vez que o período de adaptação permite que o microrganismo tenha capacidade de crescer exponencialmente sendo capaz de reduzir a estabilidade e causar a deterioração do alimento (LONGHI, 2012; MASSAGUER, 2005).

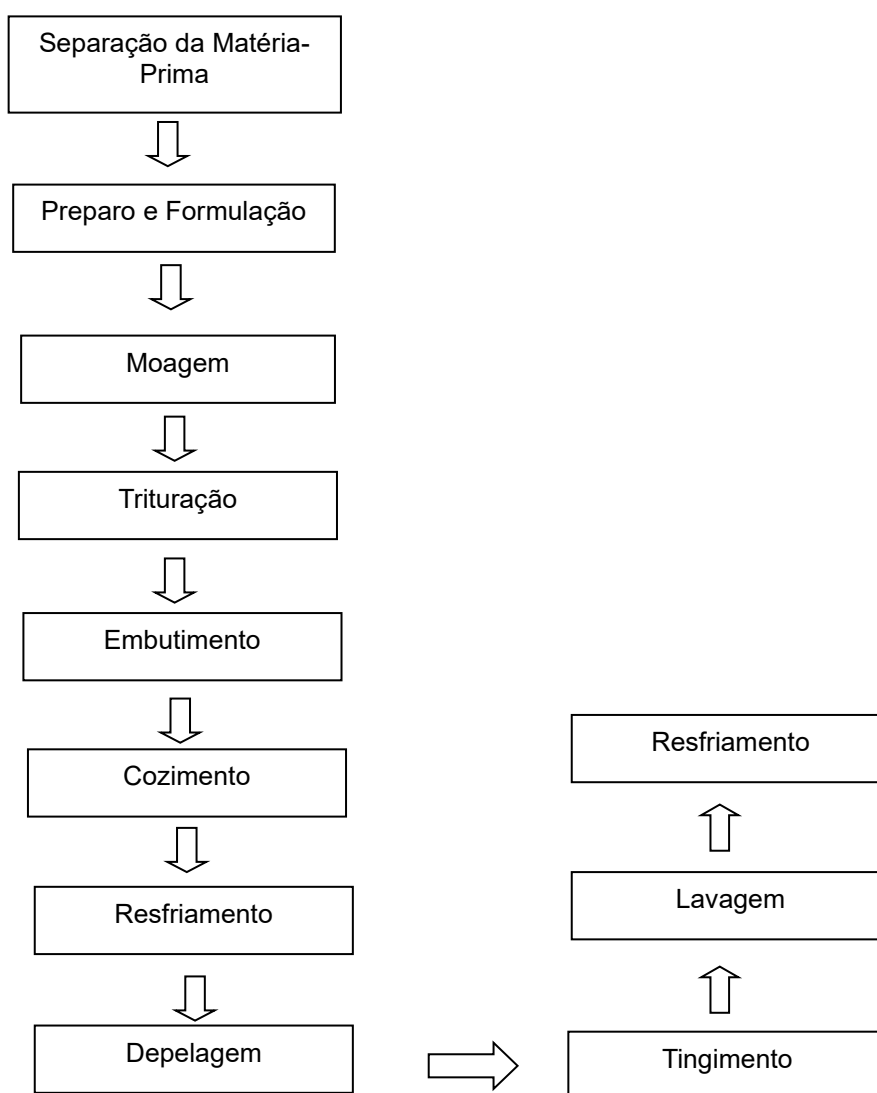
A fase exponencial, ou fase logarítmica, é caracterizada pela duplicação constante e o log da população versus o tempo resulta em uma reta, conforme pode ser mais facilmente visualizada na Figura 1.1. Já na fase estacionária, a velocidade de crescimento é igual a velocidade de morte, em virtude da exaustão de nutrientes essenciais aos microrganismos, mantendo a população constante (MASSAGUER, 2005).

Após a fase estacionária as bactérias morrem rapidamente pela redução dos nutrientes e acúmulo de substâncias inibidoras, tais como, ácidos produzidos pelo próprio metabolismo microbiano. Desta forma, na fase de morte o número de células viáveis decresce exponencialmente, de forma inversa ao crescimento durante a fase logarítmica (MASSAGUER, 2005).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Gelatina tipo A (Gelco<sup>®</sup>, Pedreira, SP), amido de milho modificado (SuperCorp<sup>®</sup> DL, Novo Horizonte, Marechal Cândido Rondon, PR), sorbitol PA (Dinâmica, São Paulo, SP), nisina (Gernisina, Ashland Industria de Ingredientes do Brasil Ltda, Cabreuva, SP) e água destilada foram utilizados na elaboração do biofilme. Para a produção de salsichas seguiu-se fluxograma representado pela Figura 2.



**Figura 2.** Fluxograma do Processamento de Salsicha.

Fonte: Autoria própria (2020).

As salsichas utilizadas neste estudo foram produzidas em um frigorífico com SIF (Serviço de Inspeção Federal), localizado na região Oeste do Paraná. Foram utilizados como ingredientes carne mecanicamente separada de aves, carne suína, água, pele suína, proteína de soja, carne mecanicamente separada de suíno, miúdos de suíno coração, amido, sal, açúcar, dextrose, cebola, pimenta preta, noz moscada, alho, regulador de acidez lactato de sódio, estabilizante tripolifosfato de sódio, espessante carragena, realçador de sabor glutamato monossódico, antioxidante eritorbato de sódio, aromatizantes (fumaça e salsicha), conservadores nitrito de sódio e nitrato de sódio e corante urucum. Após o processo de fabricação, as mesmas foram mantidas sob refrigeração e direcionadas ao laboratório do setor de pesquisa e desenvolvimento para a realização dos tratamentos com aplicação de biofilmes.

Os demais reagentes utilizados para as determinações apresentaram grau analítico.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Preparo da solução filmogênica de gelatina e amido contendo nisina

O procedimento utilizado foi baseado na metodologia proposta por Fakhouri et al. (2007), com algumas adaptações.

Separadamente, foram preparadas suspensões de amido (5% m/m) e de gelatina (10% m/m) em água destilada pela dispersão dos materiais. A suspensão de gelatina e água foi mantida em repouso por 45 min, sob temperatura ambiente, para garantir a completa hidratação da gelatina. A suspensão de amido foi mantida sob repouso por 15 min sob temperatura ambiente também para a hidratação e, em seguida, sorbitol foi adicionado a mistura (10% m/m, em relação a massa de amido) e a mesma foi mantida em repouso por mais 15 min. Na sequência, cada uma das suspensões foi aquecida a 70 °C, por 10 min. Após o aquecimento, nisina (0,025% m/m) foi adicionada na suspensão de amido gelatinizado e mantida sob agitação manual vigorosa por 5 min. Em seguida, a suspensão de gelatina foi lentamente vertida sob a suspensão de amido, mantendo-a sob agitação vigorosa manual por 5 min. A solução filmogênica obtida foi mantida em repouso para minimizar a formação de bolhas.

#### 4.2.2 Aplicação do biofilme

A aplicação do biofilme contendo nisina foi realizada no laboratório do setor de pesquisa e desenvolvimento do frigorífico que produziu as salsichas. A solução filmogênica obtida (40 kg) foi dividida em 5 recipientes com capacidade de 10 kg, previamente higienizadas e sanitizadas, onde aguardou-se atingir a temperatura de  $28 \pm 2$  °C para que se pudesse realizar a imersão das salsichas.

Após o resfriamento em chiller ( $< 5$  °C), cerca de 48 kg de salsichas (600 unidades), obtidas a partir de um mesmo lote de produção, foram imersas na solução filmogênica (120 unidades por recipiente), onde foram mantidas por 2 min para a adesão do biofilme. Após, as salsichas foram retiradas do biofilme e mantidas em recipientes vazados para o escoamento do excesso e secagem dos filmes, sob refrigeração ( $8 \pm 2$  °C). Em seguida, as salsichas foram acondicionadas em embalagens de polietileno com espessura de 20 micras, sendo distribuídas 20 unidades por embalagem (30 pacotes), submetidas a selagem a vácuo.

Adicionalmente, 48 kg de salsichas provenientes do mesmo lote de produção foram coletadas e embaladas nas mesmas condições das salsichas adicionadas de biofilme, como um controle para a comparação. As salsichas com biofilme, denominadas de salsichas tratadas e, as salsichas controle (sem biofilme) foram acondicionadas em câmara de resfriamento sob a temperatura de  $5 \pm 2$  °C até a realização das análises.

#### 4.2.3 Análises Microbiológicas

A análises microbiológicas foram realizadas de acordo com a Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) e a Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003). Foram determinados: Coliformes a 45 °C (determinação quantitativa pela técnica de Petrifilm®, AFNOR 01/02-09/89C), Estafilococos Coagulase Positiva (método ISO 6888-1), *Clostridium* sulfito redutor a 46 °C (método ISO 15213) e *Salmonella* sp. (determinação qualitativa pela técnica de presença/ausência, método AFNOR 12/16-09/05). Estas análises foram realizadas no tempo zero (após o processo de fabricação do produto).

A vida útil das salsichas foi avaliada em termos de contagem de bactérias lácticas (método APHA 4<sup>a</sup> edição) durante 42 dias de armazenamento, sendo analisadas no tempo zero (após a fabricação), 14, 21, 28, 35 e 42 dias. Todas as análises foram realizadas em duplicata, seguindo-se as recomendações descritas por Silva et al. (2007).

#### 4.2.4 Determinações físico-químicas das salsichas

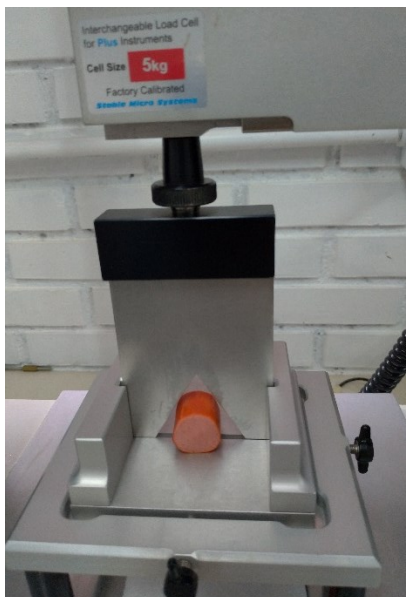
As salsichas provenientes do lote de produção utilizado no experimento tiveram a composição centesimal determinada em termos de umidade, proteína, lipídios e carboidratos, segundo as metodologias da AOAC (2005). Adicionalmente, o teor de amido das salsichas tratada e controle foi determinado segundo o método descrito pelo MAPA (2018).

As determinações físico-químicas foram realizadas nos tempos zero, 15 e 42 dias de armazenamento. Para a determinação do pH foi utilizado um potenciômetro de contato (HI 99163, Hanna *Instruments* Brasil, Barueri, SP). As medidas foram realizadas em duplicata.

Os parâmetros de cor L\* (luminosidade), a\* (intensidade de cor vermelha), b\* (intensidade de cor amarela) e h° (*hue*) (CIELAB, *Commission Internationale de L'éclairage color system*) foram determinados por meio de seis repetições, utilizando um colorímetro Minolta CR400 (Osaka, Japão) com iluminante D65 e ângulo de observação de 10 °.

A atividade de água foi determinada em um analisador Aqualab (DCG-40530, Decagon, EUA) em quadruplicata.

Para a determinação da força de cisalhamento as amostras de salsicha foram cortadas em cilindros de 2 cm de comprimento. Durante a análise, as amostras foram cortadas utilizando a lâmina Warner-Bratzler (Figura 3) com uma velocidade de teste de 2 mm/s acoplada ao texturômetro TA-HD plus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) equipado com uma célula de carga de 5 kg. A força máxima necessária para cortar as amostras foi medida e expressa em Newton (N). As determinações foram conduzidas por meio de 8 medidas para cada tratamento.



**Figura 3.** Determinação da força de cisalhamento (N) utilizando a lâmina Warner-Bratzler (HDP/WB).

Fonte: A autoria própria (2020).

#### 4.2.5 Análise dos dados

Os dados obtidos em função dos diferentes tratamentos foram avaliados pelo teste *t* de *Student* ( $p \leq 0,05$ ). Os dados obtidos a partir dos diferentes dias de armazenamento foram avaliados pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o *software* Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Na Tabela 1 são apresentados os resultados para a determinação de microrganismos patogênicos, segundo a RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) e a Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003), determinados no tempo zero (após a fabricação do produto). Todas as contagens atenderam aos padrões estabelecidos pela legislação vigente o que atesta a segurança microbiológica do produto obtido, independente do tratamento aplicado (com ou sem biofilme).

**Tabela 1.** Resultado das determinações microbiológicas de microrganismos patogênicos das amostras de salsicha controle (sem biofilme) e tratada (com aplicação de biofilme) (n = 4).

Contagens (UFC g <sup>-1</sup> )	Controle	Tratada	Limites máximos (legislação)*
Coliformes a 45 °C	<10	<10	10 <sup>3</sup>
Estafilococos Coagulase Positiva	<100	<100	3 x 10 <sup>3</sup>
<i>Clostridium</i> sulfito redutor a 46 °C	<10	<10	5 x 10 <sup>2</sup>
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência	Ausência	Ausência

\*Legislação: Brasil (2001).  
Fonte: Autoria própria (2020).

A contagem de coliformes a 45 °C é muito utilizada em análises de alimentos tratados termicamente, pois representam os microrganismos indicadores de contaminação fecal em determinadas situações, caracterizados como anaeróbios facultativos em forma de bastonetes, incluindo neste grupo espécies do gênero *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Citrobacter* (FORSYTHE, 2007). Já os estafilococos estão associados a contaminações cruzadas e práticas de higiene inadequada por parte dos manipuladores (SILVA et al., 2007). Portanto, os resultados obtidos demonstram que as boas práticas de manipulação foram seguidas durante todo o processo de produção.

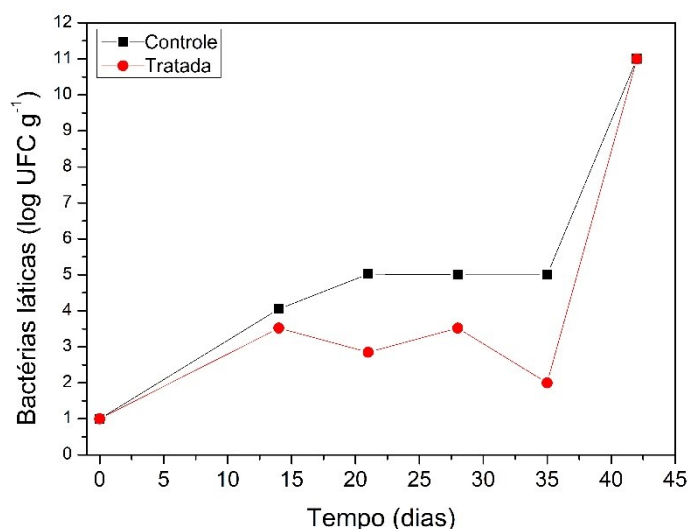
A determinação de *Clostridium* sulfito redutores assegura a qualidade microbiológica do produto cárneo obtido uma vez que a presença de *Clostridium botulinum* é responsável pelo botulismo, intoxicação alimentar causada pela ingestão de neurotoxinas pré-formadas que bloqueiam a liberação do neurotransmissor acetilcolina resultando em fraqueza muscular e subsequente paralisia (FORSYTHE,

2007). A presença de nitrito de sódio, amplamente utilizado em produtos cárneos, apresenta-se como um componente nocivo ao seu desenvolvimento, garantindo sua segurança microbiológica.

A ausência de *Salmonella* sp. nas amostras de salsichas indica que o processo de cozimento foi eficiente, uma vez que a este microrganismo não formam esporos e são relativamente sensíveis ao calor, podendo ser destruída a temperatura de 60 °C por 15 a 20 min (FORSYTHE, 2007). Durante o cozimento as salsichas atingiram a temperatura de 72 °C em seu centro geométrico, garantindo a eliminação de microrganismos patógenos como a *Salmonella*.

A curva de crescimento das bactérias lácticas determinadas nas amostras de salsicha é apresentada na Figura 4. A contagem no tempo zero foi similar nas duas amostras (1 log UFC g<sup>-1</sup>). Com 14 dias de armazenamento, a amostra controle atingiu 4,1 log UFC g<sup>-1</sup> e a amostra tratada 3,5 log UFC g<sup>-1</sup>. Entre 21 e 35 dias de armazenamento as contagens de ambas amostras permaneceram estáveis (fase *lag*), contudo, a amostra controle exibiu valores cerca de 2 logs superiores aos da amostra tratada. Estes resultados demonstram que a aplicação de biofilme contendo nisina pode ter contribuído para a redução da população de bactérias lácticas na fase *lag* de crescimento em salsichas. A aplicação de nisina como conservante em presunto fatiado foi estudada por Laranja (2016) e similarmente, foram observadas diferenças de cerca de 2 ciclos log entre presuntos tratados com nisina e controle (sem nisina) durante a fase *lag*. Contudo, no referido estudo, a nisina foi aplicada na massa e não como filme de recobrimento.

As bactérias lácticas compreendem parte da microflora inicial que se desenvolve após o processamento de carnes, estocadas a baixas temperaturas e embaladas a vácuo. Apesar dos produtos metabólicos de algumas espécies de bactérias lácticas contribuírem para a conservação do produto, como é o caso da nisina, o crescimento incontrolável de algumas espécies pode causar deterioração em carnes e produtos cárneos (HUGAS, 1998). Portanto, a sua presença em níveis superiores em produtos cárneos embalados a vácuo, como as salsichas, pode indicar a deterioração mais rápida. As bactérias lácticas podem causar alterações sensoriais, tais como, aromas e sabores indesejáveis, descoloração, redução do pH, liberação de exsudato leitoso, estufamento das embalagens e perda de vácuo, provocando a redução de sua vida útil (KREYENSCHMIDT et al., 2010).



**Figura 4.** Curva de crescimento de bactérias lácticas durante os 42 dias de armazenamento das salsichas controle (sem biofilme) e tratadas (com aplicação de biofilme contendo nisina).  
Fonte: A autoria própria (2020).

Apesar dos níveis de bactérias lácticas terem sido inferiores nas amostras tratadas com biofilme até 35 dias de armazenamento, no 42º dia ambas as salsichas atingiram 11 log UFC g<sup>-1</sup>. Kreyenschmidt et al. (2010) comenta que contagens de bactérias lácticas acima de 7 log UFC g<sup>-1</sup> em produtos cárneos estariam relacionadas ao término da vida útil do produto, uma vez que alterações sensoriais podem ser observadas. Este resultado demonstra que, apesar de um efeito protetivo até os 35 dias de armazenamento, o biofilme contendo nisina não conseguiu manter seu efeito até os 42 dias de armazenamento das salsichas, ocorrendo um aumento exponencial da contagem de bactérias lácticas. Entretanto, é importante salientar que em análises visuais observou-se que amostras de salsicha controle apresentaram estufamento e perda de vácuo a partir dos 35 dias de armazenamento, enquanto que as amostras de salsicha tratada não apresentaram alteração visuais até o 42º dia de armazenamento. Este fato pode estar associado a menor população de bactérias lácticas registradas pelas amostras de salsicha tratada até os 35 dias. Em um estudo proposto por Viola et al. (2015) a nisina foi utilizada na massa da salsicha, em sinergia com outras barreiras aplicadas, como conservante natural em salsichas, mostrando-se eficaz na conservação do produto durante 42 dias de armazenamento.

Não foram repetidas as análises após os 42 dias de armazenamento, no entanto sugere-se novas pesquisas na área de conservação em salsichas prolongando um tempo a mais para se afirmar este estudo.

## 5.2 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS

Na Figura 5 são apresentadas as imagens das salsichas tratadas com biofilme com incorporação de nisina e controle (sem biofilme). Observa-se, inicialmente, que as salsichas apresentaram aparência similar independente do tratamento aplicado.



**Figura 5.** Imagens das salsichas tratadas com biofilme contendo nisina (a) e salsichas controle (b), sem biofilme.

Fonte: Autoria própria (2020).

As salsichas do lote produzido utilizado neste estudo apresentaram a seguinte composição centesimal: 64,0% de umidade, 14,2% de proteína, 14,3% de lipídios e 3,6% de carboidratos. Os valores obtidos atenderam aos padrões recomendados pela Instrução Normativa n° 4 de 31 de março de 2000, que estabelece o regulamento técnico de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, de linguiça e de salsicha, estipulando os valores de 65% de umidade máxima, 12% de proteínas mínima, 30% de gordura máxima e 7% de carboidratos máximo (BRASIL, 2000).

Os resultados obtidos para o teor de amido, umidade e demais parâmetros físico-químicos, comparando as salsichas tratada e controle, são apresentados na Tabela 2. O teor de amido das amostras de salsicha controle (2,0%) e tratada (1,95%) não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). Estes resultados demonstram que a aplicação de biofilme com incorporação de nisina, elaborado a partir de amido de milho modificado e gelatina, não contribuiu para o aumento do teor médio de amido. O teor de amido das amostras está em conformidade com teor máximo preconizado pela instrução normativa n° 4 de 31 de março de 2000 (amido = 2%) (BRASIL, 2000).

O teor de umidade das salsichas controle variaram de 61,75 a 62,15% e entre 61,75 a 63,80% para a amostra tratada. Diferença significativa entre os tratamentos

foi observada no 14º dia de armazenamento ( $p \leq 0,05$ ), com valor superior para amostra tratada (63,80%) em comparação a controle (62,15%). Nos demais dias de armazenamento diferenças significativas não foram observadas ( $p > 0,05$ ). Em relação ao tempo de armazenamento, valores inferiores de umidade foram registrados nos tempos 0 e 42 dias para ambas as amostras. Valores de umidade similares foram reportados por Borrajo, Lima e Trindade (2016) para amostras de salsicha adicionadas de fibra de trigo (59,2 a 62,4%). Os valores obtidos durante todo o período de armazenamento estavam em conformidade com a legislação (BRASIL, 2000), que preconiza um valor máximo de umidade de 65%.

Com relação aos resultados da medida instrumental de cor, observou-se que o valor de  $L^*$  que representa a luminosidade (0 = escuro, 100 = claro) variaram de 47,59 a 48,45 para a amostra controle e de 46,01 a 51,51 para a amostra tratada, durante os 42 dias de armazenamento. Os valores não diferiram entre as amostras ao longo de todo período de armazenamento, bem como, não diferiram entre os dias de armazenamento para o mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ). Valores similares foram reportados por Ugalde (2014) em amostras de salsicha com aplicação de biofilme de amido de milho com óleos essenciais (41,65 a 49,73).

**Tabela 2.** Teor de amido (%), umidade (%) e parâmetros físico-químicos das amostras de salsicha controle (sem biofilme) e tratadas (com aplicação de biofilmes contendo nisina) durante os 42 dias de armazenamento.

Parâmetros	Tempo zero		Tempo 14 dias		Tempo 42 dias	
	Controle	Tratada	Controle	Tratada	Controle	Tratada
<b>Amido (%)</b>	2,00 <sup>a</sup> ± 0,00	1,95 <sup>a</sup> ± 0,07	-	-	-	-
<b>Umidade (%)</b>	61,75 <sup>aB</sup> ± 0,07	61,75 <sup>aB</sup> ± 0,21	62,15 <sup>bA</sup> ± 0,07	63,80 <sup>aA</sup> ± 0,00	61,75 <sup>aB</sup> ± 0,07	62,40 <sup>aAB</sup> ± 0,28
<b>L*</b>	47,81 <sup>aA</sup> ± 1,38	46,01 <sup>aA</sup> ± 1,29	47,59 <sup>aA</sup> ± 0,19	47,15 <sup>aA</sup> ± 1,90	48,45 <sup>aA</sup> ± 0,98	51,51 <sup>aA</sup> ± 0,69
<b>a*</b>	30,22 <sup>aA</sup> ± 0,25	29,40 <sup>bA</sup> ± 0,10	29,37 <sup>aA</sup> ± 1,45	28,41 <sup>aA</sup> ± 0,17	24,48 <sup>aB</sup> ± 0,74	23,82 <sup>aB</sup> ± 0,78
<b>b*</b>	48,14 <sup>aA</sup> ± 0,81	50,20 <sup>aA</sup> ± 0,29	49,00 <sup>aA</sup> ± 0,45	49,62 <sup>aA</sup> ± 0,77	49,52 <sup>aA</sup> ± 0,13	52,25 <sup>aA</sup> ± 1,63
<b>h°</b>	57,89 <sup>bB</sup> ± 0,22	59,64 <sup>aB</sup> ± 0,23	59,07 <sup>aB</sup> ± 1,48	60,20 <sup>aB</sup> ± 0,24	63,69 <sup>aA</sup> ± 0,75	65,50 <sup>aA</sup> ± 0,04
<b>Aw</b>	0,9750 <sup>aA</sup> ± 0,0003	0,9806 <sup>aA</sup> ± 0,0022	0,9717 <sup>bA</sup> ± 0,0007	0,9743 <sup>aB</sup> ± 0,0003	0,9754 <sup>aA</sup> ± 0,0020	0,9724 <sup>aB</sup> ± 0,0003
<b>pH</b>	6,70 <sup>aA</sup> ± 0,00	6,70 <sup>aB</sup> ± 0,00	6,71 <sup>aA</sup> ± 0,01	6,72 <sup>aB</sup> ± 0,03	6,00 <sup>bB</sup> ± 0,00	6,80 <sup>aA</sup> ± 0,00
<b>FC (N)</b>	15,95 <sup>aA</sup> ± 1,06	13,77 <sup>bA</sup> ± 1,45	13,71 <sup>aB</sup> ± 2,37	12,47 <sup>aA</sup> ± 2,07	15,75 <sup>aAB</sup> ± 1,61	13,69 <sup>bA</sup> ± 1,43

L\*, a\*, b\* e h° = parâmetros da medida instrumental de cor. Aw = atividade de água. FC = força de cisalhamento.

Nota: Letras minúsculas diferentes entre os tratamentos indicam diferença significativa pelo teste *t* de Student ( $p \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas diferente entre os tempos de armazenamento, comparando um mesmo tratamento, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: Autoria própria (2020).

Os valores do parâmetro  $a^*$  (verde-vermelho) (Tabela 2) variaram de 24,48 a 30,22 para a amostra controle e de 23,82 a 29,40 para a amostra tratada, indicando que amostras apresentaram tonalidade avermelhada. As amostras diferiram entre si no tempo zero ( $p \leq 0,05$ ), de modo que a controle ( $a^* = 30,22$ ) apresentou valor superior do que a amostra tratada ( $a^* = 29,40$ ). Estes resultados demonstram a aplicação do biofilme pode ter afetado a coloração das salsichas. Contudo, após 14 dias de armazenamento, as amostras apresentaram valores similares entre si ( $p > 0,05$ ) e estes valores também foram similares estatisticamente aos seus respectivos valores no tempo zero. Tanto a amostra controle quanto a tratada apresentaram valores do parâmetro  $a^*$  inferiores no 42° dia de armazenamento em comparação aos tempos zero e 14 dias ( $p \leq 0,05$ ), e estes valores foram similares entre si ( $p > 0,05$ ). Esta alteração da tonalidade avermelhada das salsichas durante o armazenamento sugere a reação de degradação da cor (ARAÚJO et al., 2019), demonstrando que a aplicação do biofilme não afetou esta reação.

Os valores para o parâmetro  $b^*$  (azul-amarelo) não diferiram entre os tratamentos e não diferiram durante o armazenamento ( $p > 0,05$ ). Valores entre 48,14 a 49,42 foram obtidos para a amostra controle e, valores entre 49,62 a 52,25 foram obtidos para a amostra tratada. Estes resultados demonstram que as amostras apresentaram tonalidade amarela.

A amostra tratada (59,64) apresentou valores de ângulo hue ( $h^\circ$ ) superiores a amostra controle (57,89) no tempo zero ( $p \leq 0,05$ ). Nos tempos de 14 e de 42 dias de armazenamento, não houve diferença entre os tratamentos, contudo, no 42° dia observou-se que tanto a amostra controle quanto a tratada, tiveram um aumento no valor de  $h^\circ$  em comparação aos tempos de armazenamento anteriores ( $p \leq 0,05$ ). Estas diferenças estão associadas a variação previamente reportada para o parâmetro  $a^*$  em função dos tratamentos.

Os valores de atividade de água ( $A_w$ ) variaram entre 0,9717 e 0,9754 para a amostra controle e, entre 0,9806 a 0,9724 durante os 42 dias de armazenamento. Os valores não diferiram entre os tratamentos no tempo 0 e no tempo de 42 dias de armazenamento ( $p > 0,05$ ). Contudo, foram inferiores na amostra controle no tempo de 14 dias ( $p \leq 0,05$ ). Os valores de  $A_w$  da amostra controle não diferiram durante os 42 dias de armazenamento ( $p > 0,05$ ). Já na amostra tratada, o valor diminuiu a partir dos 14 dias de armazenamento ( $p \leq 0,05$ ). Estes resultados podem estar relacionados a possíveis interações hidrofílicas entre os componentes do biofilme (amido

modificado e gelatina) e a água livre da salsicha, conseqüentemente, reduzindo o valor de  $A_w$  da amostra durante o armazenamento. A redução da atividade de água também é fator relevante para propiciar aumento da vida útil do produto.

O valor de pH das amostras de salsicha controle diferiram das amostras tratadas apenas no 42º dia de armazenamento ( $p \leq 0,05$ ), apresentando valores inferiores (controle = 6,00; tratada = 6,80). Dentre as alterações promovidas por bactérias ácido-láticas uma delas é a produção de ácidos (KREYENSCHMIDT et al., 2010), portanto, nas amostras controle sugere-se que a produção de ácido deve ter sido superior, resultando na alteração do valor de pH da salsicha.

Com relação aos valores de força de cisalhamento (FC) (Tabela 2), as amostras de salsicha controle exibiram valores superiores nos tempo zero (15,95 N) e 42 dias de armazenamento (15,75 N), em comparação aos valores obtidos para as amostras tratadas (13,77 e 13,69, respectivamente) ( $p \leq 0,05$ ). Os resultados demonstraram que no início e no final da vida útil as salsichas com biofilme (tratadas) apresentaram-se mais macias que as amostras controle. O aumento da dureza de salsichas tem sido associada as condições de armazenamento e as perdas de exsudato (CANDOGAN, KOLSARICI, 2003). Correlacionado os resultados de FC e  $A_w$ , pode-se sugerir que a redução do conteúdo de água livre observado nas amostras com biofilme ao longo do armazenamento deva ter favorecido no aumento da maciez das salsichas em comparação a controle. Valores de FC similares foram reportados por Andrade (2012) para salsichas de frango.



## 6 CONCLUSÃO

Nisina foi incorporada em biofilmes a base de amido de milho modificado e gelatina e aplicada no recobrimento de salsichas. As salsichas tratadas com biofilme e as controle (sem biofilme) atenderam aos padrões estabelecidos pela legislação vigente, comprovando a segurança microbiológica do produto.

Durante a avaliação da vida útil, o estudo demonstrou que o biofilme contendo nisina teve efeito protetivo em salsichas até 35 dias de armazenamento, reduzindo a contagem de bactérias lácticas em até 2 ciclos log em comparação ao controle. Porém, não se manteve efetivo a partir de 42 dias de armazenamento.

Em análises visuais observou-se que amostras de salsicha controle apresentaram aspecto diferenciado como estufamento, “melada” e com perda de vácuo a partir dos 35 dias de armazenamento, enquanto as amostras de salsicha tratada não apresentaram alteração visual até os 42 dias de armazenamento.

Conclui-se que o desenvolvimento de um biofilme a base de amido e gelatina, com incorporação de nisina, para aplicação em salsichas contribuiu para a redução da população de bactérias lácticas, apresentando efeito na vida útil do produto. Contudo, sugere-se a realização de novos estudos para garantir a segurança alimentar de salsichas em trabalhos posteriores, variando a concentração de nisina nos biofilmes e o uso combinado com outros compostos antimicrobianos, para garantir o efeito protetivo do biofilme por um período maior.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, J. C. **Aspectos de qualidade para caracterização de salsichas comerciais**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2017. 103 p.

AOAC. American Organization of Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18th ed. Arlington: AOAC. 2005.

ARAÚJO, M. S.; SILVA, F. S.; OLIVEIRA, G. M.; FERREIRA JÚNIOR, N.; RODRIGUES, V. H.; SOUZA, A. R. M. Cinética de degradação da cor da salsicha. **Revista Desafios**, v. 6, ed. especial, 2019. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.20873/uft.2359365220196Especialp86>> Acesso em 30 de setembro de 2019.

BORRAJO, K. H. T.; LIMA, C. G.; TRINDADE, M. A. Satedade subjetiva, aceitação sensorial e aspectos tecnológicos de salsicha com adição de fibra de trigo. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 19, p. 1-8, 2016.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. Diário Oficial da União: Brasília, 05 de abril de 2000. Disponível em <[http://www.lex.com.br/doc\\_20302\\_INSTRUCAO\\_NORMATIVA\\_N\\_4\\_DE\\_31\\_DE\\_MARCO\\_DE\\_2000.aspx](http://www.lex.com.br/doc_20302_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_4_DE_31_DE_MARCO_DE_2000.aspx)> Acesso em 30 de setembro de 2019.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União: Brasília, 02 de janeiro de 2001. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b)> Acesso em 18 de novembro de 2019.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003**. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União: Brasília, 18 de setembro de 2003. Disponível em <[http://www.lex.com.br/doc\\_598283\\_INSTRUCAO\\_NORMATIVA\\_N\\_62\\_DE\\_26\\_DE\\_AGOSTO\\_DE\\_2003.aspx](http://www.lex.com.br/doc_598283_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_62_DE_26_DE_AGOSTO_DE_2003.aspx)> Acesso em 18 de novembro de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 156 p. Disponível em <[http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/guia\\_alimentar\\_populacao\\_brasileira.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira.pdf)> Acesso em 07 de dezembro de 2019.

CANDOGAN, K.; KOLSARICI, N. The effects of carrageenan and pectin on some quality characteristics of low-fat beef frankfurters. **Meat Science**, v. 64, n. 2, p. 199-206, 2003.

CESAR, A. P. R. **Listeria spp. e Listeria monocytogenes na produção de salsichas tipo Hot Dog e hábitos de consumidores**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciência Animal), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008. 108 f.

Disponível em: <[https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tde/910/1/Dissertacao\\_Alessandra\\_Cesar.pdf](https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tde/910/1/Dissertacao_Alessandra_Cesar.pdf)> Acesso em 30 de setembro de 2019.

ENGEL, G.; PIZATO, S.; KALSCHNE, D. L.; SILVA-BUZANELLO, R. A.; HABU, S.; CANAN, C. Conservação de salsichas utilizando biofilme de quitosana. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 7, n. 1, p. 42-57, 2016. Disponível em <<https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa>> Acesso em 24 de setembro de 2019.

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; GONÇALVES, P. V. M.; MILANEZ, C. R.; STEEL, C. J.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 2, p. 369-375, 2007. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n2/26.pdf>> Acesso em 27 de setembro de 2019.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2ª ed., 2006. 602 p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Artmed, Porto Alegre, 2007.

GALLO, J-A Q.; DEBEAUFORT, F.; CALLEGARIN, F.; VOILLEY, A. Lipid hydrophobic, physical state and distribution effects on the properties of emulsion based films. **Journal of Membrane Science**, v. 180, p. 37-46, 2000. Disponível em <[https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)00531-7](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)00531-7)> Acesso em 27 de setembro de 2019.

GEITENES, S., OLIVEIRA, M. F. B.; KALSCHNE, D. L.; SARMENTO, C. M. P. Modelagem do Crescimento de Bactérias Lácticas e Análise Microbiológica em Apresentado e Presunto Cozido Fatiados e Embalados a Vácuo. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 15, n. 1, 2013.

GHARSALLAOUI, A.; OULAHAL, N.; JOLY, C.; DEGRAEVE, P. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, p. 1262-1274, 2016a. Disponível em <<https://www.tandfonline.com/loi/bfsn20>> Acesso em 30 de setembro de 2019.

GHARSALLAOUI, A.; OULAHAL, N.; JOLY, C.; DEGRAEVE, P. Nisin as a Food Preservative: Part 2: Antimicrobial Polymer Materials Containing Nisin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, p. 1275-1289, 2016b. Disponível em

<<https://doi.org/10.1080/10408398.2013.763766>> Acesso em 30 de setembro de 2019.

GORDON, A.; BARBUT, S. Mechanisms of meat batter stabilization: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 4, p. 299-332, 1992.  
HAMM, R. Biochemistry of meat hydration. **Advances in Food Research**, v. 10, p. 355-463, 1960.

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

KREYENSCHMIDT, J.; HUBNER, 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

LARANJA, D. C. **Atividade antimicrobiana da nisina em presunto cozido sobre *Listeria monocytogenes* e bactérias ácido lácticas**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016. 70 p.

LONGHI, D. A. **Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, 2012. 116 p.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 1 ed. revisada. Brasília: MAPA, 2018. 160 p. Disponível em: <[https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/credenciamento-e-laboratorios-credenciados/legislacao-metodos-credenciados/poa/copy3\\_of\\_Manualdemtodosoficiaisparaanlisedealimentosdeorigemanimal1ed.rev\\_.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/credenciamento-e-laboratorios-credenciados/legislacao-metodos-credenciados/poa/copy3_of_Manualdemtodosoficiaisparaanlisedealimentosdeorigemanimal1ed.rev_.pdf)> Acesso em 02 de novembro de 2020.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Livraria Varela, 2005. 258 p.

MCMEEKIN, T. A.; BROWN, J.; KRIST, K.; MILES, D.; NEUMEYER, K.; NICHOLS, D.S.; OLLEY, J.; PRESSER, K.; RATKOWSKY, T D. A.; ROSS, M. S.; SOONTRANON, S. Quantitative Microbiology: A Basis for Food Safety, **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, 1997.

NETO, C. A. Biofilmes antimicrobianos protegem alimentos. **Jornal da UNICAMP**, Campinas, 2009. Disponível em <[https://www.unicamp.br/unicamp/unicamp\\_hoje/ju/setembro2009/ju440pdf/Pag11.pdf](https://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/setembro2009/ju440pdf/Pag11.pdf)> Acesso em 24 de setembro de 2019.

PINILLA, C. M. B. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de nanolipossomas contendo nisina e extrato de alho (*Allium***

*sativum* L.). (Dissertação de Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016. 102 f. Disponível em:

<<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/141304>> Acesso em 24 de setembro de 2019.

ROMANO, M. A.; FARIA, J. A. F. Sistemas de embalagens para carne industrializada. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, 320 ed., 2003.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M. Sistemas de embalagens plásticas para preservação de carne bovina e derivados. In: **Ciência e Tecnologia da Carne Bovina**. Campinas: CTC/ITAL, p. 58-70, 1994.

SINGH, V. P. Recent approaches in food bio-preservation: a review. **Open Veterinary Journal**, v. 8, n. 1, p. 104-111, 2018. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.4314/ovj.v8i1.16>> Acesso em 30 de setembro de 2019.

SOUZA, I. M. **Inativação de *Weissella viridescens* por radiação ultravioleta e seu efeito na vida útil de salsicha embalada a vácuo**. (Trabalho de Conclusão de Curso), Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018. 55 p. Disponível em <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/188735>> Acesso em 30 de setembro de 2019.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 2007. 533 p.

UGALDE, M. L. **Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais**. Tese (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada (URI), Erechim, 2014. 162 p.

VIOLA, I. K.; KARAM, B. L.; KLEMZ, B. P.; SOUZA, I. G. et al. **Aplicação de nisina como conservante natural em salsichas**. In: ANAIS DO SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS, 2015. Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2015. Disponível em: <<https://proceedings.science/slaca/slaca-2015/papers/aplicacao-de-nisina-como-conservante-natural-em-salsichas>> Acesso em: 04 nov. 2020.