

**UFRRJ**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**UTILIZAÇÃO DE PEDIOCINA EM PRODUTO CÁRNEO TIPO LINGÜIÇA  
FRESCAL TOSCANA PARA CONTROLE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES***

**Honorato Pradel Neto**

**2007**

**UFRRJ**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**UTILIZAÇÃO DE PEDIOCINA EM PRODUTO CÁRNEO TIPO LINGÜIÇA  
FRESCAL TOSCANA PARA CONTROLE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*.**

**HONORATO PRADEL NETO**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Antonio Tavares da Silva**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em conservação de alimentos, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Agosto de 2007

**UFRRJ**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**HONORATO PRADEL NETO**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em conservação de alimentos, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/8/2007

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Antonio Tavares da Silva  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Nédio Jair Wurlitzer  
CETEC de Alimentos e Bebidas SENAI-RJ

---

Prof. Dra. Rosa Helena Luchese  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho as minhas filhas Clarissa e Alice pelas quais tenho me esforçado em tornar-me um verdadeiro mestre.

## **AGRADECIMENTOS**

A diretoria do Centro de Tecnologia de Alimentos do SENAI do Rio de Janeiro que incentivou a realização deste curso.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro que proporcionou o curso.

Ao Dr Nédio Jair Wurlitzer, chefe do Núcleo de Desenvolvimento de Produtos e Pesquisas do Centro de Tecnologia de Alimentos do SENAI do Rio de Janeiro que coordenou o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Dr Antonio Tavares que foi mestre, orientador e amigo.

A minha esposa Elisinha por todo apoio durante o curso e aos colegas Cássia , Bernardo e Simone pelas preciosas colaborações.

## RESUMO

PRADEL, Honorato. **UTILIZAÇÃO DE PEDIOCINA EM PRODUTO CÁRNEO TIPO LINGÜIÇA FRESCAL TOSCANA PARA CONTROLE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES***.- Seropédica: UFRRJ, 2007. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)

A produção de alimentos seguros com relação a microrganismos patogênicos é exigência da legislação, sendo a *Listeria monocytogenes* um dos patógenos que devem ser controlados. Entre as formas de controle a utilização de bacteriocinas é das mais promissoras. A pediocina é um tipo de bacteriocina produzida pelo *Pediococcus acidilactici* e que tem ação contra *Listeria monocytogenes*, podendo ser usada como ingrediente ou aditivo no produto sendo considerada uma opção viável e complementar a outros métodos de conservação. Neste trabalho foi avaliada a ação da pediocina sobre *Listeria monocytogenes* inoculada a massa de lingüiça frescal tipo Toscana e foi feito o acompanhamento da contagem microbiana do tempo inicial até 30 dias, comparando-se o tratamento controle, sem adição de pediocina, com o tratamento teste adicionado de 1% de pediocina, em meio seletivo e não seletivo para *Listeria monocytogenes* e a contagem total de aeróbios mesófilos respectivamente. A adição de pediocina à massa de lingüiça reduziu em média de 2 ciclos log a contagem de *Listeria monocytogenes*, quando comparado ao tratamento controle. O efeito ocorre rapidamente, já sendo percebido na primeira contagem. Entretanto não se observou diferença na contagem total de aeróbios mesófilos entre o tratamento controle e o tratamento adicionado de 1% de bacteriocina, sugerindo que a pediocina tem ação específica sobre microrganismos como a *Listeria monocytogenes*.

**Palavras-chave:** Conservação. Pediocina. Lingüiça. *Listeria*.

## ABSTRACT

PRADEL, Honorato. **USE OF PEDIOCINS IN MEAT PRODUCTS LIKE TOSCANA FRESH SAUSAGE TO CONTROL *LISTERIA MONOCYTOGENES***.- Seropédica: UFRRJ, 2007. 58 p. Dissertation (Master Science in Food Technology)

The production of safe food with regard to pathogenic microorganisms is requirement of the legislation, being the *Listeria monocytogenes* one of the pathogens that must be controlled. Bactericins, among the preservations methods available in the literature, can be used to improve microbial reductions. The pediocin is a type of bacteriocin produced by the *Pediococcus acidilactici* and get action against *Listeria monocytogenes*. It could be used as an ingredient or additive into the product, being applied as a viable and complementary action to other conservation methods. In this work, the action of pediocina against *Listeria monocytogenes*, inoculated into a mass of Toscana fresh type sausage was evaluated, and the microbial growth was carried out to 30 days, comparing the control treatment, without pediocin added, with treatment with 1% of pediocin added, into selective and non selective media for *Listeria monocytogenes* . The results that the addition of pediocina, into the sausage mass, caused an average reduction of 2 logarithimic growing cycles over the *Listeria monocytogenes* counting, in the selective media, when compared with the control treatment. The effect occurred promptly, already being observed in the first counting. In the non selective media, no difference between the control treatment and the treatment with 1% of pediocin added was observed, suggesting that pediocin have specific action over microorganisms like *Listeria monocytogenes*

**Key words:** Conservation. Pediocin. Sausage. *Listeria*

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	6
1. INTRODUÇÃO .....	8
2. OBJETIVOS .....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
3.1 <i>Listeria monocytogenes</i> como microorganismo patogênico em alimentos .....	15
3.2 Uso de bacteriocinas para controlar <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos ....	17
3.3 Produtos cárneos .....	20
3.4 Lingüiças .....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
4.1 Pediocina .....	24
4.2 Cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	24
4.3 Fabricação de lingüiças .....	24
4.4 Avaliação microbiológica da lingüiça .....	27
4.5 Procedimentos .....	27
4.6 Adição de pediocina á massa .....	28
4.7 Quantificação de <i>L.monocytogenes</i> e bactérias aeróbias .....	30
4.8 Delineamento experimental e avaliação estatística .....	33
5. RESULTADOS .....	34
5.1 Avaliação microbiológica da lingüiça .....	34
5.2 Avaliação da sobrevivência de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	34
5.3 Avaliação da sobrevivência de bactérias mesófilas totais .....	40
6. CONCLUSÕES .....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45
8. ANEXOS .....	48



## 1. INTRODUÇÃO

O mercado mundial de carnes apresenta produção crescente segundo dados apresentados pela ABIEPCS (2005). A produção mundial de carnes foi de 257 milhões de toneladas, destacando-se as carnes suína, de frango e bovina. O Brasil destaca-se na produção de carnes, tendo produção anual de 41 milhões de bovinos abatidos, quatro bilhões de frangos e 34,5 milhões de suínos, em 2004, representando uma produção anual de 24,4 bilhões de dólares, sendo exportados 4,5 bilhões (ABIEPCS, 2005).

O setor de derivados de carne manteve-se entre 2001 e 2005 em primeiro lugar no “ranking” dos principais setores da indústria de produtos alimentares no Brasil em valor e esta situação deve permanecer no ano de 2007. (ABIA, 2007)

INDÚSTRIA DA ALIMENTAÇÃO - PRINCIPAIS SETORES EM VALOR					
	2001	2002	2003	2004	2005
LATICÍNIOS	2°	4°	4°	4°	4°
BENEFICIAMENTO DE CAFÉ, CHÁ E CEREAIS	3°	3°	2°	3°	2°
DERIVADOS DE CARNE	1°	1°	1°	1°	1°
ÓLEOS E GORDURAS	4°	2°	3°	2°	3°
DERIVADOS DO TRIGO	5°	5°	5°	6°	6°
AÇÚCARES	6°	6°	6°	5°	5°
DERIVADOS DE FRUTAS E VEGETAIS	8°	8°	7°	7°	7°
DIVERSOS	7°	7°	7°	8°	8°
CHOCOLATE, CACAU E BALAS	9°	9°	9°	9°	9°
CONSERVAS DE PESCADOS	10°	10°	10°	10°	10°

**Quadro 1** – Ranking dos principais setores da indústria de produtos alimentares em valor de 2001 a 2005. ADAPTADO DE ABIA/2007

A crescente exigência do mercado consumidor por alimentos cada vez mais seguros e os requisitos de segurança alimentar estabelecidos pelos órgãos regulamentadores tem levado as indústrias alimentícias a adotarem programas de gestão da qualidade severos. Os primeiros passos são os de implantação de sistemas de segurança alimentar, como as BPF (boas práticas de fabricação), implantação do APPCC (análise de perigos e pontos críticos de controle), entre outros programas de qualidade. Ferramentas são necessárias para auxiliar aos técnicos das indústrias a identificar perigos, estabelecer limites críticos, formas de monitoramento e medidas corretivas.

A melhoria de condições dos serviços públicos de saúde e direitos do consumidor está evidenciando um aumento no número de casos de doenças transmitidas por alimentos, o que exige dos fabricantes de produtos alimentícios novas ações relacionadas à segurança alimentar. Estimativas realizadas nos Estados Unidos, pelo *Center for Disease Control and Prevention*, mostram que 76 milhões de casos de enfermidades relacionados ao consumo de alimentos ocorrem a cada ano, onde 5000 destes casos são fatais (MEAD et al., 1999).

Os custos relacionados a problemas alimentares provocados por *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Toxoplasma gondii*, estão entre 6,5 e 34,9 bilhões de dólares, apenas nos Estados Unidos (PADHYE e DOYLE, 1992).

Para fazer frente a essas novas exigências de segurança alimentar, os principais processos complementares de redução de patógenos envolvem processos físicos de conservação, como a alta pressão e pasteurização pós-embalagem, e a utilização de substâncias antimicrobianas. A alta pressão tem como principal inconveniente o alto custo de equipamentos, enquanto que processos térmicos como a pasteurização pós-embalagem, não podem ser aplicados em alguns tipos de alimentos, devido a alterações físicas e sensoriais indesejáveis (CLEVELAND, 2002).

A utilização de bacteriocinas como agentes atuantes contra bactérias patogênicas está sendo considerada como aplicação adequada e opção a outros métodos de conservação de maior custo. Assim, é adequado o desenvolvimento de pesquisas com vistas a estabelecer efeitos de conservação e condições de processo, para aplicação em sistemas industriais, tendo produtos de laticínios e produtos cárneos, enorme potencial. Tradicionalmente, as bacteriocinas têm sido definidas como compostos protéicos, produzidos por bactérias que inibem (efeito bacteriostático) ou destroem (efeito bactericida) espécies relacionadas (CHEN e HOOVER, 2003).

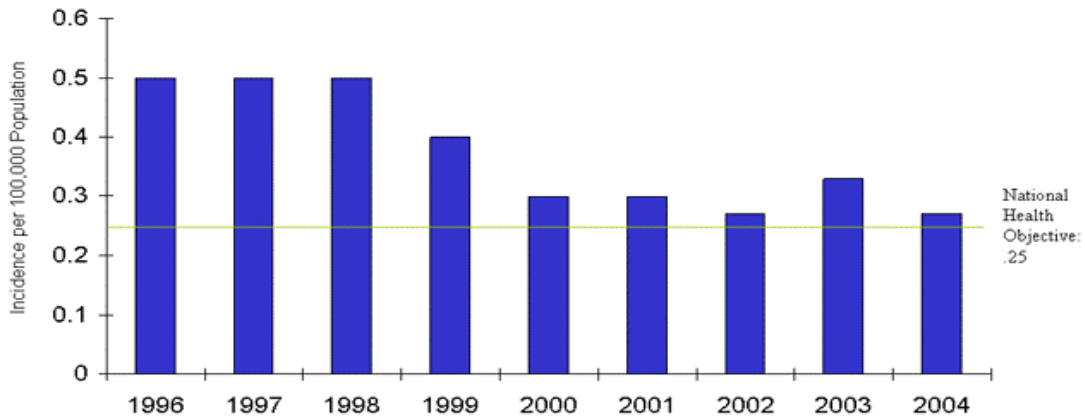
Como visibilidade de mercado, a aplicação de bacteriocinas tem tendência de inserir-se nos processos de fabricação, como uma das tecnologias adequadas a fazer frente aos requisitos legais e de segurança aos consumidores. No mercado de produtos de laticínios, a aplicação da nisina, uma bacteriocina, está tendo grande crescimento, mesmo considerando os seus custos. Para produtos cárneos, é importante verificar quais bacteriocinas terão efetividade de aplicação, sendo as pediocinas e enterocinas aquelas as quais os trabalhos iniciais em pesquisa básica indicam melhores resultados. A contribuição nos avanços das pesquisas em bactérias lácticas, com melhoria de cepas para uso na fermentação dos alimentos, beneficiará tanto o consumidor quanto o produtor (CAPLICE e FITZGERALD, 1999).

Formas de conservar os alimentos e de promover a redução de patógenos necessitam constantes aprimoramentos e adequações a condições locais. A aplicação de bacteriocinas em produtos cárneos na Europa já é uma prática comum. No Brasil é muito comum o consumo de lingüiças mistas do tipo frescal, produtos de origem animal que apresentam alta atividade de água e, por serem intensamente manipulados e não serem submetidos a tratamentos térmicos, podem conter microrganismos patogênicos. Este produto, que têm grande aceitação de consumo, tem sido relacionado com surtos de toxinfecções alimentares, principalmente causados por fraco cozimento ou contaminação cruzada. É um produto muito perecível e que requer cuidado adicional para garantir a segurança alimentar (SILVA et al., 2004).

Mesmo em países onde o setor produtivo alimentício apresenta um alto nível de desenvolvimento, como nos Estados Unidos, estima-se que anualmente 76 milhões de pessoas sejam acometidos por algum tipo de doença de origem alimentar, levando a 325.000 hospitalizações e 5.200 mortes. As perdas anuais decorrentes de enfermidades de origem alimentar são estimadas entre US\$ 5 a US\$ 6 bilhões contabilizando-se despesas médicas e perda de produtividade (FDA, 2005).

Nas duas últimas décadas, a *Listeria monocytogenes* foi reconhecida como um dos mais importantes microrganismos patogênicos causadores de toxinfecções de origem alimentar (MEAD, 1999).

Na Figura 1 podemos observar, segundo dados do Office of Public Health and Science, que a incidência de listerioses nos U.S.A. de 1996 a 2004, embora tenha reduzido, ainda permaneceu acima do nível considerado ideal (OPHS, 2005).

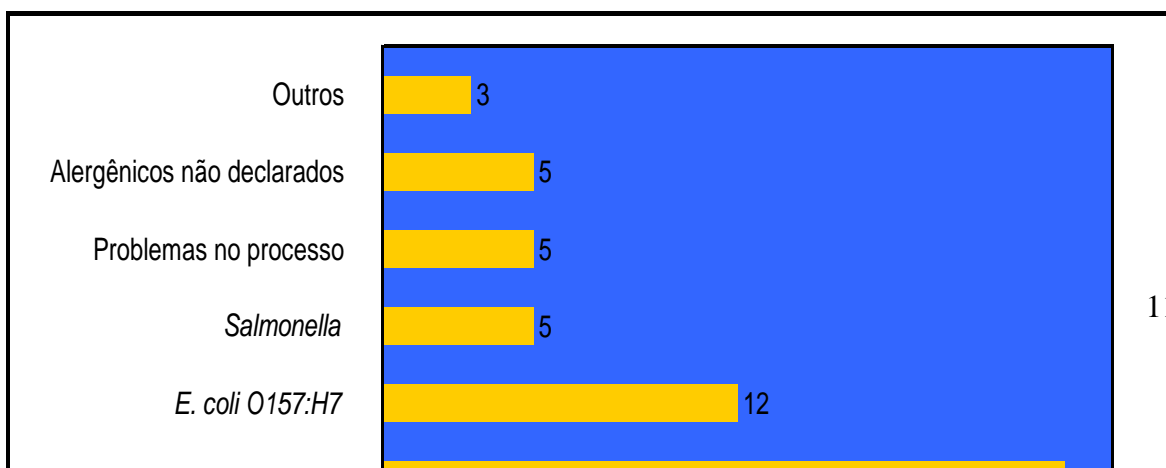


**Figura 1** – Incidência de listerioses nos U.S.A. de 1996 a 2004.

Fonte OPHS, 2005.

A maioria dos casos de listeriose está associada aos indivíduos com comprometimento imunológico, como gestantes e seus fetos, neonatos, idosos, indivíduos HIV positivos. Também como pessoas que estão sendo submetidas a tratamentos quimioterápicos. Neste caso, o nível de mortalidade está entre 20 e 30%. Os casos em indivíduos saudáveis com idade adulta raramente são fatais, além de não existirem disponíveis dados confiáveis, uma vez que a grande maioria destes casos é diagnosticada como sendo uma simples gripe (OPHS, 2005).

Embora as carnes frescas apresentem, geralmente, baixas contagens de *Listeria* à medida que aumenta seu grau de processamento, aumenta o risco de contaminação (JAY, 1996). Na Figura 2 estão apresentados casos de “recall” em 2003, nos EUA, e os perigos envolvidos, comprovando a afirmação anterior.



## **Figura 2** – Casos de “recall” em 2003, nos EUA, e os perigos envolvidos

Fonte: OPHS, 2005

Organismos internacionais tratam o caso com a gravidade que merece, porém no âmbito nacional, os estudos dos casos envolvendo este microrganismo ainda são pontuais e não se relacionam, resultando em um cenário onde, aparentemente, não representa um grau de risco que justifique maior informação ao público e medidas mais amplas de controle.

A disseminação de *Listeria monocytogenes* em plantas de processamento de lingüiça mista do tipo frescal é, ainda, pouco esclarecida, tornando-se relevante avaliar sua presença nesses produtos, gerando informações que auxiliem no controle da bactéria na linha de processamento e assegurem a comercialização de um alimento com qualidade higiênico-sanitária (SILVA et al. 2004).

As causas mais prováveis da falta de um maior volume de dados científicos e de informações sobre os problemas relacionados a *Listeria* no cenário nacional, seriam os altos custos analíticos e uma deficiência na interação dos estudos realizados, tanto dentro do setor alimentício como no hospitalar, e pouca exigência de controle governamental.

As bacteriocinas são proteínas que normalmente apresentam atividade inibitória para algumas espécies e cepas de bactérias, sendo, por este motivo, utilizadas como agentes antimicrobianos em diversos alimentos. A nisina e a pediocina são exemplos de bacteriocinas produzidas por determinadas cepas de *Lactococos lactis* e *Pediococcus* ssp. respectivamente, capazes de inativar a *Listeria* (LOUGUERCIO et. al.,2001)

A utilização de bacteriocinas como agentes atuantes contra bactérias patogênicas está sendo considerada como aplicação adequada e complementar a outros métodos de conservação.

## **2. OBJETIVOS**

Avaliar o efeito da adição de pediocina (bacteriocina) à massa de lingüiça frescal tipo Toscana, sobre o comportamento de sobrevivência do microrganismo patogênico *Listeria monocytogenes* e sobre o comportamento de sobrevivência dos microrganismos aeróbios mesófilos totais.

Estabelecer, a níveis regionais, critérios para a utilização de pediocina em lingüiça frescal tipo Toscana.

Disponibilizar tecnologia complementar para conservação de produtos cárneos.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. *Listeria monocytogenes* como microrganismo patogênico em alimentos

Dentre os microrganismos causadores de doenças de origem alimentar, a *Listeria monocytogenes* vem sendo reconhecida como um dos mais importantes. A listeriose é uma doença oportunista, que pode atingir índices letais de até 30% em populações sensíveis, com deficiências no sistema imunológico, como mulheres grávidas e seus fetos, neonatos, idosos e pacientes em tratamento quimioterápico. Em indivíduos saudáveis, seus sintomas não ultrapassam características semelhantes à de uma gripe, com febre constante e mal estar geral. *Listeria* apresenta destaque por conseguir se desenvolver sob temperaturas de refrigeração e em condições limitadas de oferta de oxigênio, como em alimentos embalados a vácuo. Os membros do gênero *Listeria* são microrganismos amplamente distribuídos no ambiente, encontrando-se, atualmente, constituído por cinco espécies (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivannovii*, *L. innocua* e *L. welshimeri*). Dentre as espécies, *Listeria monocytogenes* é inquestionavelmente patogênica para o homem e, ao contrário da maioria dos patógenos de origem alimentar, que geralmente provocam sintomas de origem gastrointestinal, as principais manifestações clínicas de listeriose são, inicialmente, semelhantes a um resfriado, com febre baixa, mal estar geral, podendo progredir para meningite, meningoencefalite, septicemia, aborto ou parto prematuro. Existem treze sorotipos potencialmente patogênicos de *L. monocytogenes*, porém 95% dos isolados em casos comprovados pertencem aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b (FARBER e PETERKIN, 1991).

O primeiro caso de listeriose humana ocorreu em 1929, estabelecendo-se a partir de então a correlação entre *L. monocytogenes* e meningite em humanos. Em 1950, estudos médicos sugeriram a possibilidade das toxinfecções alimentares causadas pela *L. monocytogenes*. Todavia, somente em 1981, no Canadá, comprovou-se o primeiro surto de listeriose veiculada por alimentos. Este surto envolveu 41 pessoas e o alimento contaminado foi uma salada preparada à base de repolho cru. O repolho, adubado com estrume de ovinos suspeitos de serem portadores da bactéria, foi o veículo da contaminação. Desde então, inúmeros casos vêm sendo reportados em diversos países (BAHK, 1990).

Segundo SEELIGER e JONES (1986) as bactérias do gênero *Listeria*, apresentadas na Figura 3, são bastonetes Gram positivo curtos, não esporogênicos, anaeróbicos facultativos, com extremidades arredondadas, medindo 0,4 a 0,5 micras de diâmetro e 0,5 a 2,0 micras de comprimento. Podem ocorrer isoladamente em cadeias curtas ou arranjadas em ângulo formando "V" entre si ou em grupos que se mantêm paralelos ao longo dos eixos. Cresce em temperaturas de -0,4 a 45°C, valores de pH de 4,0 a 9,4 e em atividade de água (Aw) de 0,92 ou maior e em concentrações de cloreto de sódio de até 10% . É catalase positiva, oxidase negativa e produz colônias beta-hemolíticas em agar sangue. Este microorganismo é extensamente distribuído na natureza e pode ser encontrada em frutas e vegetais, no solo, água, silagens, leite de vacas saudáveis ou com mastite, assim como na flora intestinal normal de muitas espécies animais e em humanos. Nestes há evidências que a residência do microorganismo no trato intestinal ocorre com uma frequência de 2 a 10% da população, sem que estes indivíduos tenham nenhum tipo aparente de alteração em sua saúde. É inativado por tratamentos térmicos acima de 70°C, como os utilizados em cozimentos e pasteurizações



**Figura 3** –Microfotografia de *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* tem sido isolada em alimentos como leites crus e pasteurizados, queijos (particularmente em variedades com baixa maturação), sorvetes, vegetais “in natura”, produtos cárneos fermentados, carnes cruas de todos os tipos (bovina, suína e de aves) e em peixes crus e defumados. O grupo de alimentos considerado de maior risco compreende produtos prontos para o consumo e armazenados em temperaturas de refrigeração, onde, uma vez contaminado, não há nenhum processo que elimine ou reduza esta contaminação a um nível aceitável, antes de seu consumo, e em baixas temperaturas, o microorganismo se torna bastante competitivo. *L. monocytogenes* causa doenças por



penetração do microrganismo nas paredes do trato gastrointestinal e, então, infecções em várias partes normalmente estéreis do corpo. O período de incubação para manifestação dos sintomas pode variar de poucos a dias até três meses (FAO/WHO, 2005).

Para se atingirem níveis de redução nos casos de listerioses, em países onde a garantia da segurança alimentar é mais desenvolvida, estão associados os esforços das indústrias e dos órgãos governamentais em implementarem ações que assegurem a inoquidade dos alimentos. Entre estas ações destacam-se:

- (a) implementar as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e aplicar o plano APPCC;
- (b) promover a manutenção e controle da cadeia do frio, impedindo abusos e variações de temperatura;
- (c) desenvolver novas tecnologias que se apliquem no processo industrial, no transporte e na comercialização, que consigam eliminar ou impedir o desenvolvimento deste microorganismo e.
- (d) aplicar e esclarecer a importância da comunicação de riscos junto às indústrias e consumidores (FARBER e PETERKIN, 1991).

### **3.2. Uso de bacteriocinas para controlar o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* em alimentos**

Bacteriocinas são compostos antimicrobianos protéicos produzidos por muitos tipos de bactérias. A maioria das bacteriocinas são moléculas pequenas, têm um alto ponto isoelétrico e contêm propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas (MONTVILLE e WINKOWSKI,1997).

KLAENHAMMER (1993) propôs uma divisão das bacteriocinas em 4 grupos:

Grupo I - caracterizadas por conterem aminoácidos não usuais, tais como a lantionina e beta-metilantiona. As bacteriocinas que contêm estes aminoácidos são chamadas de lantibióticos. A nisina pertence a este grupo.

Grupo II - Neste grupo enquadram-se diversas bacteriocinas constituídas de pequenas moléculas de proteínas termoestáveis. Estas são geralmente formadas por peptídeos não maiores que 5 kDa as quais são subdivididas em três subgrupos:

Subgrupo Iia - Pertencem a este subgrupo as bacteriocinas pediocina, leucocina, bavaricina e curvacina, as quais têm atividade contra *Listeria monocytogenes*.

Subgrupo Iib - Contém as bacteriolactocinas G, M e lactacina F, as quais requerem dois peptídeos diferentes para a sua atividade.

Subgrupo Iic - Contém a lactacina B que requer baixas concentrações de cisteína para a sua atividade.

Grupos III e IV – Diferem das demais por conterem grandes proteínas antimicrobianas termolábeis (>30kDa), tais como as helveticinas J e V, produzidas pelos *Lactobacillus helveticus*, as lactacinas A e B, e a enterolisina, produzida pelo *Enterococcus faecium*, que são classificadas como bacteriocinas do grupo II, enquanto no grupo IV encontram-se bacteriocinas com composição mistas com lipídios ou carboidratos.

Tentativas de usar esses compostos para o controle da *Listeria* em alimentos tomaram duas direções: a adição de bacteriocina diretamente ao alimento na forma purificada e a adição da bactéria produtora de bacteriocina ao alimento para que ela cresça e produza a bacteriocina “in situ”. Algumas recentes revisões sumarizam resultados de experimentos que usaram bacteriocinas para controlar *Listeria* em alimentos e discutem modelos da ação desses compostos, fatores que afetam suas eficácias e o desenvolvimento de resistência da *Listeria* (DOYLE, 1999). Em particular, MURINA, (1996) discute o uso de bacteriocinas para o controle de *Listeria*.

Desde que se conhece que *Lactobacillus* são capazes de produzir diferentes bacteriocinas e muitos deles também são utilizados em culturas iniciadoras para a produção de embutidos, a adição de bactérias produtoras de bacteriocinas tem sido empregada no controle de *Listeria* em muitos alimentos fermentados (DE MARTINS e FRANCO, 1998).

Alguns tipos de produtores de bacteriocinas não crescem bem sob refrigeração e estes são mais utilizados no controle de *Listeria* em condições de abuso de temperatura ao invés do armazenamento sob refrigeração. Outras bactérias produzem elevados níveis de bacteriocinas a baixas temperaturas (DOYLE, 1999).

Os *Lactobacillus* também produzem ácido láctico com conseqüente acidificação do alimento e, em alguns casos, o efeito antilisterial tem sido atribuído ao ácido láctico ao invés de ser atribuído a bacteriocina (DOYLE, 1999).

Produzida pelo *Lactobacillus casei* crl 705, a lactocina 705 é uma bacteriocina que exerce um moderado efeito inibidor sobre o crescimento da *Listeria* em carne moída (VINGOLO et al, 1996). Outros experimentos com cloreto de sódio, nitrito e lactato

adicionados à carne demonstram que estes sais de cura reduziram a eficácia da lacticina (VINGOLO et al, 1998).

A nisina tem sido comumente utilizada na preservação de alimentos devido ao seu status de “produto seguro para alimentos” (GRAS) e seu bom efeito antilisterial. É uma bacteriocina produzida pelo *Lactococcus casei*. Vários fatores que afetam a atividade inibidora da nisina foram investigados no crescimento de culturas e modelos foram desenvolvidos para prever os possíveis efeitos em sistemas alimentares.

A pediocina AcH (*Pediococcus acidilactici*) tem um forte efeito antilisterial com uma concentração inferior à nisina, entretanto, em carnes como as de porco, esta bacteriocina reduz a população de *Listeria* por 2 logs em 24 horas, mas perde a sua eficácia ao longo do tempo, aparentemente devido à rápida degradação por proteases da carne. O encapsulamento da pediocina em lipossomos (glóbulos de gorduras) ou a adição de um emulsificador (Tween 80), aumentam seu efeito antilisterial em bifés. Bactérias produtoras de pediocinas quando adicionadas a parte da cultura inicial na produção de salsichas de frango inibiram a *Listeria* durante o período de fermentação do produto. Uma vantagem adicional do uso da pediocina é sua resistência à degradação térmica. Ela pode ser adicionada à carne crua e mantém suas características após o cozimento. Pós contendo pediocina foram produzidos e aplicados a filmes para embalagem de alimentos. Houve inibição do crescimento de *Listeria* na superfície dos produtos (MURINA, 1996).

Produzida pelo *Lactobacillus reuteri* a reuterina é uma bacteriocina de largo espectro, solúvel em água, efetiva em uma ampla faixa de pH e resistente as ações de enzimas proteolíticas e lipolíticas. Quando adicionada a superfície de carne de porco cozida ou misturada a carne de porco crua a reuterina reduz em até 3 logs a população de *Listeria*. Ácido láctico realça a eficácia desta bacteriocina.

A sakacina k é produzida pelo *Lactobacillus sake* CTC 494, inibe o crescimento de *Listeria innocua* em carne crua de porco, carne de frango e carne de porco cozida. A maior redução de *Listeria* ocorreu em carne empacotada a vácuo ou em atmosfera modificada (DOYLE, 1999).

### **3.3. Produtos Cárneos**

Os alimentos, quer sejam industrializados ou não, mantêm-se em constante atividade biológica, manifestada por alterações de natureza química, física, microbiológica ou enzimática, podendo levar à perda de qualidade e redução da vida-de-prateleira. Destas alterações, a de maior preocupação com a segurança dos consumidores é a microbiológica.

A elevada atividade de água e o pH da carne tornam esse produto um meio ideal para o desenvolvimento microbiológico. O manuseio em boas condições sanitárias, a estocagem a baixa temperatura e o sistema de embalagem são elementos chaves no aumento da vida-de-prateleira (SARANTÓPOULOS, 2001).

Na antiguidade, o homem descobriu algumas formas de prolongar a vida útil da carne, transformando-a em produtos como carne seca, salgada, defumada, e descobriu que se salgando e condimentando a carne picada, e depois embutindo em tripa natural também conservaria a carne (PARDI, 1993).

Em carnes *in natura* e produtos derivados, mesmo conservados pela aplicação de calor, cozimento, e depois mantidos em refrigeração, podem apresentar microrganismos patogênicos, entre eles *Listeria monocytogenes*, causador de doenças em indivíduos imunocomprometidos, idosos e crianças. Muitas vezes a contaminação ocorre por manuseio após o cozimento, em etapas anteriores a embalagem (MING et al, 1997).

Para redução da carga microbiana dos alimentos, a utilização de matérias-primas de boa qualidade e a aplicação das boas práticas de fabricação deve ser observada. Em produtos industrializados, os processos de conservação têm papel importante, baseando-se na destruição total ou parcial dos microrganismos capazes de alterar o alimento, ou na modificação ou eliminação de um ou mais fatores (intrínseco ou extrínseco) que são essenciais para a sua multiplicação, de modo que o alimento não se torne propício ao desenvolvimento microbiano (NATRAJAN e SHELDON, 2000).

Um ambiente anaeróbio, obtido com embalagem a vácuo ou com atmosfera modificada sem oxigênio, pode retardar o crescimento de microrganismos aeróbios deterioradores e aumentar a durabilidade dos produtos. Contudo, o pigmento da carne adquire uma coloração arroxeadada, que pode limitar sua aceitação no mercado, além da potencialidade de crescimento de anaeróbios. Portanto, a opção de conservação de carnes em ambiente aeróbio e anaeróbio é um compromisso entre cor vermelha e vida útil, associada à deterioração microbiológica (SARANTÓPOULOS et al, 2001).

Em produtos cárneos, é comum o uso de ácido láctico e seus sais, entre eles o lactato de sódio, com objetivo de controle de bactérias patogênicas e deterioradoras como

no caso de salsichas, sendo normalmente aplicado diretamente na formulação do produto (MELO, 2002).

Nitratos e nitritos são muito utilizados em produtos cárneos e queijos, em concentrações máximas de 0,2% e 0,02%, respectivamente; possuindo efeito inibidor sobre bactérias anaeróbias, especialmente *Clostridium botulinum*. (GIOVA, 1997).

### 3.4. Lingüiça

A Instrução Normativa nº 4 de 31 de março de 2000 (BRASIL, 2000) define lingüiça como o produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionados ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, e submetido ao processo tecnológico adequado.

As características físico-químicas (BRASIL, 2000) e o padrão microbiológico (BRASIL, 2001) de lingüiça fresca podem ser observados nos Quadros 2 e 3, respectivamente.

Constituintes	%
Umidade (máximo)	70
Gordura (máximo)	30
Proteína (mínimo)	12
Cálcio (base seca) (máximo)	0,1

**Quadro 2** - Características físicas e químicas de lingüiça fresca (BRASIL,2000).

Grupos de microorganismos	Tolerância para amostra indicativa (UFC)	Tolerância para amostra representativa (UFC)			
		n	c	m	M

Coliformes à 45°C	5.10 <sup>3</sup>	5	3	5.10 <sup>2</sup>	5.10 <sup>3</sup>
Estafilococos coagulase positiva/g	5.10 <sup>3</sup>	5	2	10 <sup>3</sup>	5.10 <sup>3</sup>
Clostrídio sulfito redutor	3.10 <sup>3</sup>	5	2	5.10 <sup>2</sup>	3.10 <sup>3</sup>
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência	-	-	-	-

**Quadro 3** - Padrão microbiológico de lingüiça frescal (BRASIL, 2001).

Vários autores têm trabalhos sobre as tecnologias empregadas para a produção de lingüiças e estas são do conhecimento da maioria dos processadores deste alimento tão apreciado entre os brasileiros. Entre estes autores, se destaca PARDI, (1993) que em seu livro “Ciência, higiene e tecnologia da carne” apresenta os conceitos a seguir descritos.

A carne é um alimento rico em nutrientes para a alimentação, mas se deteriora facilmente se não for usado um método conveniente de conservação. A fabricação de lingüiças tem sido adotada como forma de conservar melhor a carne, fornecer ao consumidor um produto de paladar variado e adequado, e para a indústria aproveitar melhor a chamada "carne de segunda". Existem, atualmente, muitos tipos de lingüiças, variando na sua formulação, processo de fabricação, tipo de tripa utilizada e diferentes métodos de conservação. As lingüiças se classificam de acordo com o tratamento térmico em: frescas, cozidas e defumadas, podendo sofrer outras variações de acordo com a condimentação utilizada, o tipo de matéria-prima (suína, bovina, aves, mista), a granulometria da carne, o tamanho dos gomos, calibre das tripas, etc. Dessa forma, as características devem ser estabelecidas por cada fabricante, dando ao produto especificações próprias (PARDI, 1993).

Para a produção de lingüiças são empregadas matérias-primas, condimentos e aditivos que têm funções importantes na fabricação do embutido, como estão listados a seguir.

**Carnes:** Matéria-prima principal, que dá característica ao produto, podendo ser carne de porco, bovina, frango ou outras.

**Proteína de soja:** têm a função de diminuir o custo da formulação, substituindo parte da carne.

**Água/gelo:** têm a função de melhorar características sensoriais do produto, deixar mais suculento, além de, se utilizada gelada, diminuir e manter a temperatura baixa da massa.

Cura: aditivo utilizado como conservador e para dar coloração avermelhada ao produto cárneo. O cloreto de sódio juntamente com o nitrito e o açúcar constitui o tripé da cura.

Emulsificante: têm como função dar liga aos pedaços de carne, facilitando o corte do produto e não deixando que este se esfarele; uso permitido apenas em embutidos cozidos.

Glutamato monossódico: têm a função de "arredondar" o sabor do produto.

Lactato de sódio: substância que tem certo efeito conservador, sendo usada quando se deseja maior tempo de comercialização e estocagem do produto embutido.

Fixador de cor: têm como função manter a cor do produto, sendo normalmente utilizado ascorbato de sódio.

Envoltórios artificiais flexíveis: os envoltórios artificiais flexíveis são constituídos de celulose, de colágeno comestível, de colágeno não comestível e de plástico.

Envoltórios naturais: são provenientes de intestinos, bexiga, esôfago e mesmo estômago e pele de suínos em alguns casos.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Pediocina**

A pediocina utilizada nos testes foi proveniente do desenvolvimento de *Pediococcus acidilactici*, obtida na forma comercial, liofilizada, marca ALTA 2341 do fabricante Kerry.

Foi seguida a indicação de aplicação do fabricante de 1% (p/p) adicionado diretamente à massa da lingüiça toscana frescal.

### **4.2. Cepas de *Listeria monocytogenes***

Para a realização dos testes, foram adquiridos junto a Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), três cepas de *Listeria monocytogenes*, 1/2a, 1/2b e 4b, consideradas as mais potencialmente patogênicas.

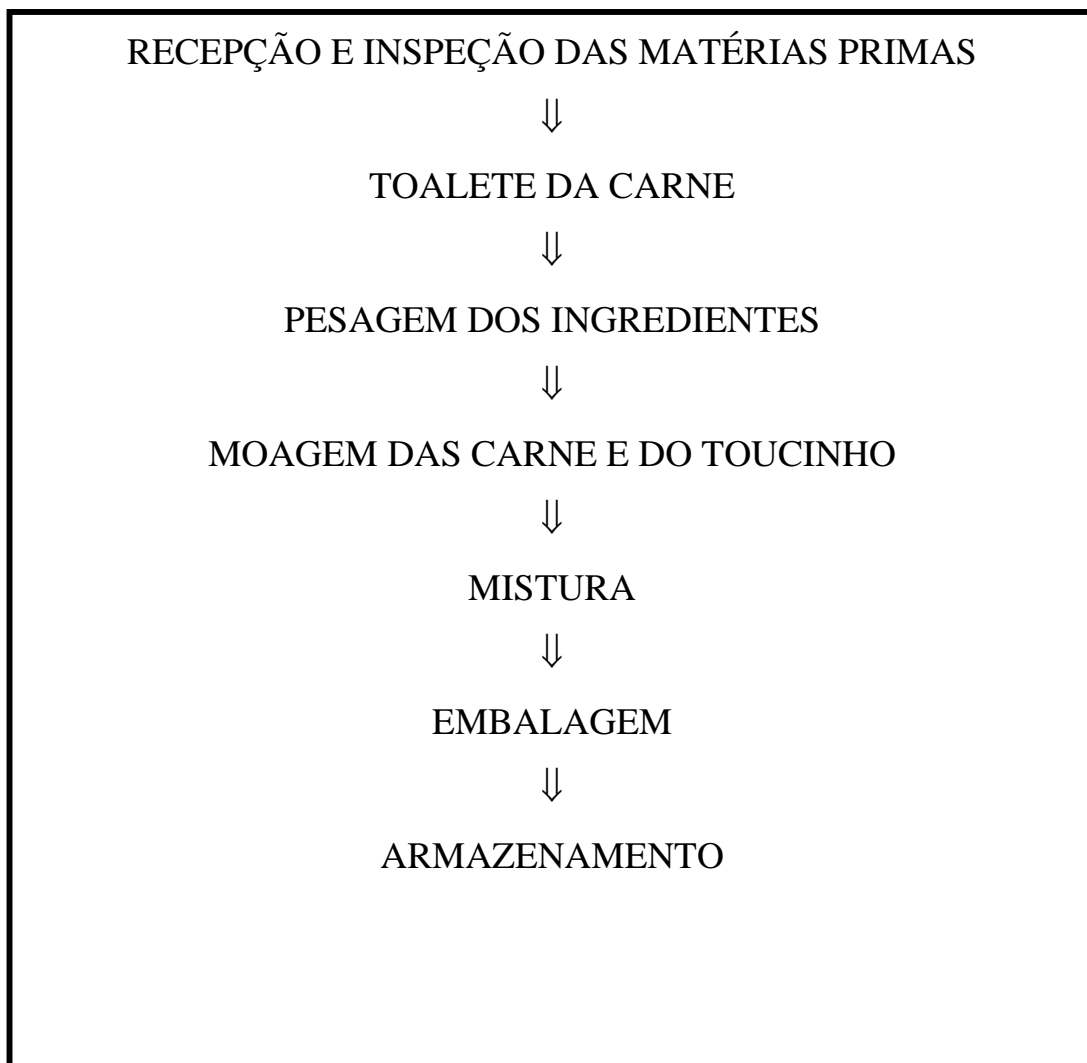
As culturas foram encaminhadas ao CETEC em tubos de ensaio contendo agar infusão cérebro coração (BHI Oxoid) e foram conservadas em a 5°C ( $\pm$  1°C) sendo propagadas a cada 15 dias em caldo de infusão cérebro coração (BHI Oxoid).

### **4.3. Fabricação da lingüiça**

Para a realização dos testes do experimento foram produzidos na planta de produtos cárneos do CETEC de alimentos 15 kg de massa de lingüiça frescal tipo Toscana.

O processamento, seguiu as etapas descritas na Figura 4 e a formulação descrita no Quadro 4.





**Figura 4** - Fluxograma do processo utilizado para a produção da massa de lingüiça Toscana.

MATÉRIAS-PRIMAS	%	kg
-----------------	---	----

Paleta suína	73.00	10.950
Toucinho	20.00	3.000
Água/ gelo	3.00	0.450
Sal	1.50	0.225
Cura (sal +nitrito + nitrato)	0,25	0.038
Glicose (Mor-Rex 1940-Maltodextrina)	1.00	0.150
Condimento para lingüiça Toscana	0.50	0.075
Harmonix (glut. mon. + ptn veg hidrol)	0.50	0.075
Fixador de cor	0.25	0.038
<b>TOTAL</b>	<b>100.00</b>	<b>15.000</b>

**Quadro 4** - Formulação utilizada para a produção da massa de lingüiça toscana.

No processamento foram utilizadas carnes resfriadas, não congeladas e limpas, sendo retirados os nervos, cartilagens e gânglios.

As carnes mais macias e sem nervos, foram moídas em disco com furos de diâmetro de 12mm e as carnes mais duras foram moídas em discos com furos de 5mm de diâmetro.

O toucinho foi moído junto com a carne. Foi utilizada gordura suína firme (toucinho do lombo) o que possibilita ter menor perda de gordura.

Foram adicionadas as carnes e todos os ingredientes no misturador, sendo feita a homogeneização da massa até ter consistência e liga suficiente.

A massa produzida não foi embutida, visto que para os testes, este tipo de processamento dificultaria a inoculação e posterior verificação do contaminante. Desta forma a massa foi acondicionada em sacos plásticos de 0,5 L de volume, onde cada um recebeu aproximadamente 500g de massa. A massa obtida no misturador foi embalada a vácuo, e levada imediatamente para o congelamento (congelamento lento), com temperatura da câmara entre -18 e -21°C. As amostras foram estocadas em temperatura de congelamento e os testes com a pediocina (bacteriocina) foram realizados no laboratório de microbiologia, seguindo condições controladas de descongelamento e inoculação.

Os equipamentos empregados no processamento foram os seguintes: moedor; misturador; seladora a vácuo e câmara de congelamento.

**4.4. Avaliação microbiológica da lingüiça**

Uma amostra do produto elaborado foi remetido ao laboratório de análises microbiológicas, imediatamente após o término do processo, para avaliação da contaminação de acordo com a Resolução nº 12 de 2001, do Ministério da Saúde, que estabelece padrões microbiológicos para alimentos. Foram determinadas as contagens de *E.coli*, clostrídios sulfito redutores a 46°, estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* sp. Para estas análises foram utilizadas as metodologias recomendadas pela Instrução Normativa nº 63 de 2003 do Ministério da Agricultura.

#### **4.5. Procedimento**

Foi utilizada a massa de lingüiça Toscana frescal, produzida na planta piloto, para avaliar o efeito da pediocina sobre *Listeria monocytogenes* e sobre os microrganismos aeróbios mesófilos da amostra. Para esta avaliação, a massa de lingüiça foi contaminada com *Listeria monocytogenes*, tendo seu comportamento acompanhado periodicamente por análises de quantificação de *Listeria monocytogenes*. Análises de contagem padrão em placas foram realizadas, visando acompanhar o comportamento dos microrganismos aeróbios mesófilos, na presença da pediocina.

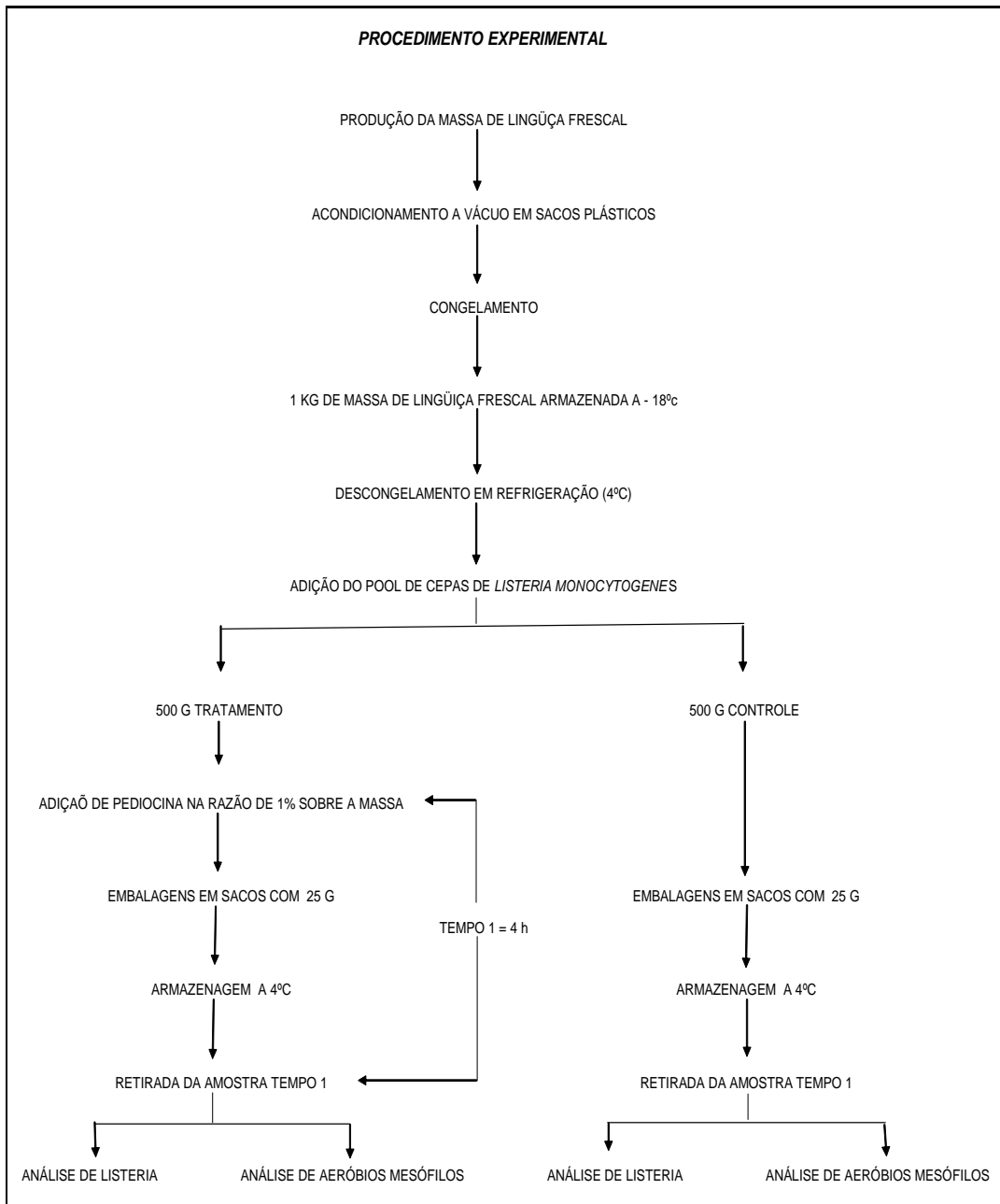
Foram realizadas três baterias de testes de aplicação de pediocina sobre massa de lingüiça frescal. A primeira bateria transcorreu durante os meses de novembro e dezembro de 2005, a segunda durante os meses de janeiro e fevereiro de 2006 e a terceira durante os meses de março e abril de 2006. Cada bateria constou do acompanhamento da carga microbiana total e de *Listeria monocytogenes* durante 30 dias na amostra sem tratamento e da amostra com tratamento.

#### **4.6. Adição de pediocina à massa**

A amostra foi retirada da câmara de armazenamento e descongelada lentamente, sob refrigeração a 4°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) num período de 24 horas. Foram utilizadas quatro embalagens com uma massa suficiente para os experimentos. A porção de amostra descongelada foi levada à capela de fluxo laminar e homogeneizada.

A partir da massa descongelada, esta foi inoculada com a mistura de cepas de *Listeria monocytogenes*. A inoculação com as de cepas proporcionou a massa uma contagem inicial média de *Listeria* de 6,31 log de unidades formadoras de colônias por grama da massa. A amostra foi então separada em duas partes. A uma das partes foi adicionada 1% de pediocina, enquanto a outra parte (amostra controle) não houve a adição de pediocina.

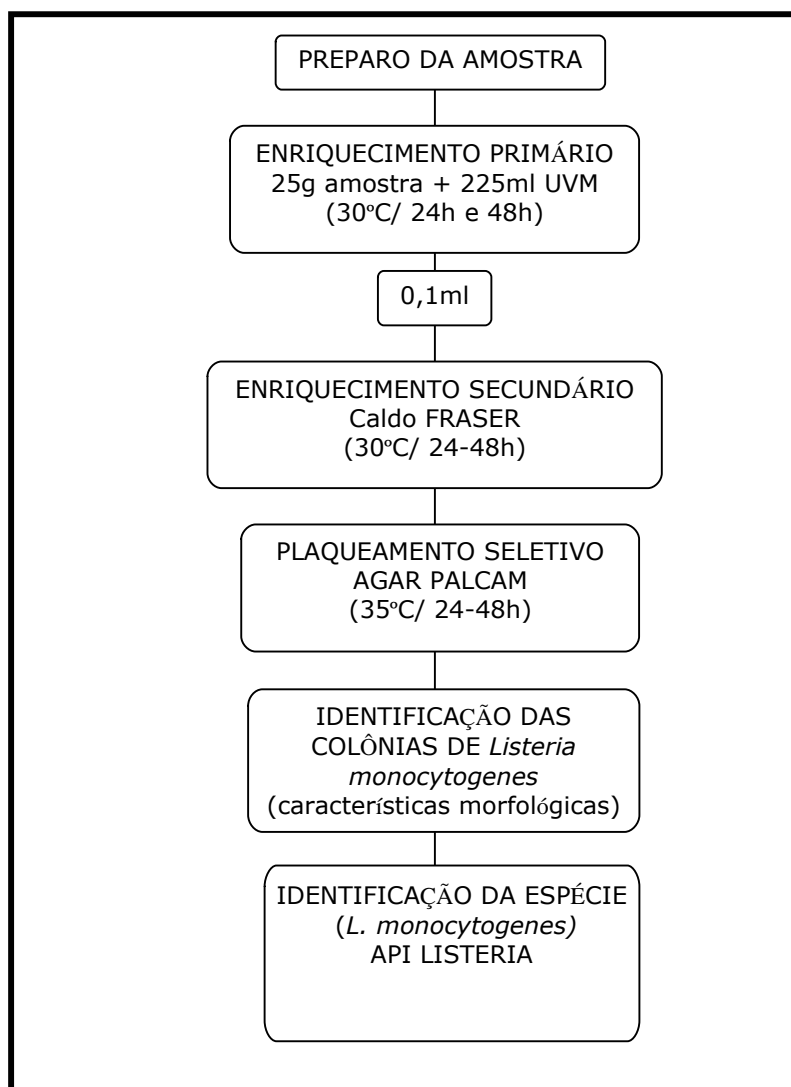
As amostras “controle” e “tratamento” foram embaladas em pequenas porções em sacos de polietileno de onde foram retiradas as primeiras alíquotas de 25g, para análises microbiológicas de contagem de bactérias aeróbias mesófilas e contagem de *Listeria*, denominadas amostras do tempo 1, equivalente a 4 horas após a adição da pediocina. A seguir foram armazenadas sob refrigeração entre 4°C e 6°C. Das amostras “controle” e “tratamento” armazenadas foram retirados alíquotas de 25 gramas periodicamente, para as análises microbiológicas de quantificação da microbiota. Estas amostras foram denominadas amostra do tempo 2 (1 dia após a inoculação), tempo 3 (dois após a inoculação), tempo 4 (quatro dias após a inoculação), tempo 5 (8 dias após a inoculação), tempo 6 (15 dias após a inoculação) e tempo 7 (30 dias após a inoculação). O esquema simplificado dos testes está apresentado na Figura 5.



**Figura 5** - Representação esquemática do procedimento experimental

#### 4.7. Quantificação de *Listeria monocytogenes* e bactérias aeróbias mesófilas

As análises microbiológicas foram realizadas seguindo-se metodologias oficiais estabelecidas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) na Instrução Normativa N° 62 de 2003 (IN 62/2003). Foram feitas diluições decimais seriadas até a diluição  $10^{-8}$ . A inoculação foi feita por superfície (*spread plate*) nos meios PCA para microrganismos aeróbios mesófilos e PALCAM para *Listeria*. Foi utilizado o Kit api<sup>R</sup> da empresa bioMérieux para a confirmação das cepas de *Listeria monocytogenes*. A Figura 6 mostra as principais etapas do método analítico para *Listeria monocytogenes* segundo o capítulo XIV da IN 62/2003 do MAPA.



**Figura 6** - Esquema para isolamento de colônias de *Listeria*.

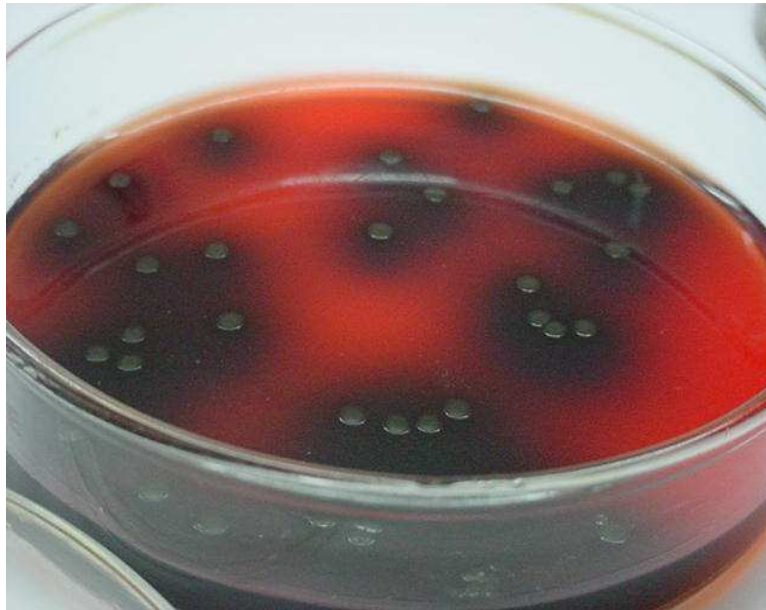
Todo o trabalho seguiu rigoroso controle das Boas Práticas de Laboratório, utilizando-se recursos adequados como pode ser observado na Figura 7.

A cada placa foi inoculado 0,1ml da diluição, obtendo-se placas com diluições seriadas de  $10^{-2}$  a  $10^{-8}$ . As placas para contagem de bactérias totais foram incubadas a 35°C por 48 h em aerobiose. As placas para contagem de *Listeria* foram incubadas a 35°C por 48 h em microaerofilia utilizando-se jarras de anaerobiose e bomba de vácuo. As colônias foram identificadas observando-se as alterações características no meio de culturas, conforme apresentado na Figura 8 e a contagem das colônias seguiu as recomendações legais da Instrução Normativa nº 62 de 2003 do Ministério da Agricultura. A confirmação da espécie do microrganismo foi feita através de uma bateria de testes bioquímicos apresentada na forma de um kit de teste conforme demonstrado na Figura 9.

A cada tempo estudado foram analisadas amostras controle e tratamento em triplicata.



**Figura 7** - Inoculação das amostras em capela de fluxo laminar



**Figura 8** - Placa de Agar Palcam com desenvolvimento de colônias típicas de *Listeria*.



**Figura 9** - Bateria do Kit api® para teste bioquímico com combinação de resultados confirmativa para *Listeria monocytogenes*.

#### 4.8. Delineamento experimental e avaliação estatística



Para a realização deste experimento foram aplicados os princípios básicos da experimentação moderna relatados por Frederico Pimentel Gomes (1990). Estes princípios têm sua aplicação motivada pela presença, em todo experimento, de efeito de fatores não controlados. Esses efeitos não podem ser conhecidos individualmente e alteram pouco ou muito, os resultados obtidos e são indicados pela designação geral de variação do acaso ou variação aleatória. A aplicação dos princípios da experimentação oferecem aos pesquisadores formas de avaliar se as diferenças observadas num experimento têm ou não valor, isto é, se são ou não significativas.

Neste experimento foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com teste de F a 5% e 15 de significância. Foram aplicados dois tratamentos, com pediocina e sem pediocina, cada um repetido 3 vezes com sete tempos diferentes produzindo-se 1 grau de liberdade para tratamento e 41 graus de liberdade ao todo, o número de graus de liberdade para o resíduo, obtido por diferença, foi de 40.

As hipóteses testadas no experimento foram as seguintes:

$H_0 \Rightarrow$  Os tratamentos com pediocina e sem pediocina são equivalentes.

$H_1 \Rightarrow$  Os tratamentos com pediocina e sem pediocina não são equivalentes.

Admitindo-se a hipótese de nulidade ( $H_0$ ), sabemos que a variância causada nas observações devido aos tratamentos e a variância causada nas observações devido ao resíduo (acaso e fontes de variações não controladas) não deveriam diferir a não ser por acaso. Para compará-las usamos o teste F onde encontramos valores tabelados em função da influência do resíduo sobre os tratamentos. As tabelas de F dão valores para os níveis de 5% e 1% de probabilidade. Isto quer dizer que quando F calculado é menor que F tabelado há uma possibilidade de 95% ou 99% da causa da variância ser atribuída ao acaso e não ao tratamento.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação microbiológica da lingüiça

A lingüiça frescal tipo Toscana, produzida para os testes na planta piloto de produtos cárneos do SENAI/RJ - foi analisada no laboratório de análises microbiológicas, sendo os resultados apresentados no Quadro 5.

Microorganismo	Contagem	Valor máximo RDC 12/01 MS
<i>E. coli</i>	4 x 10 <sup>3</sup> ufc/g	5 x 10 <sup>3</sup> ufc/g
Clostrídio sulfito Redutor 46°C	< 10 ufc/g	3 x 10 <sup>3</sup> ufc/g
Estafilococos coagulase positiva	< 10 <sup>2</sup> ufc/g	5 x 10 <sup>3</sup> ufc/g
<i>Salmonella sp</i>	Ausência / 25 g	Ausência / 25 g

**Quadro 5** – Média das contagens, de microrganismos em amostra representativa de lingüiça Toscana de acordo com especificações da Resolução do Ministério da Saúde.

De acordo com a RDC nº. 12 / 2001 do Ministério da Saúde, em função dos resultados analíticos observados, podemos considerar que o produto em questão pode ser considerado "PRODUTO OU LOTE DE ACORDO COM OS PADRÕES LEGAIS VIGENTES"

### 5.2. Avaliação da sobrevivência de *Listeria monocytogenes*

Os dados das contagens as médias e os desvios padrão das contagens, em valores logarítmicos, de *Listeria monocytogenes* na lingüiça frescal adicionada com pediocina e da amostra controle, sem a adição da pediocina, com as respectivas repetições de cada bateria, são apresentados no Quadro 6.

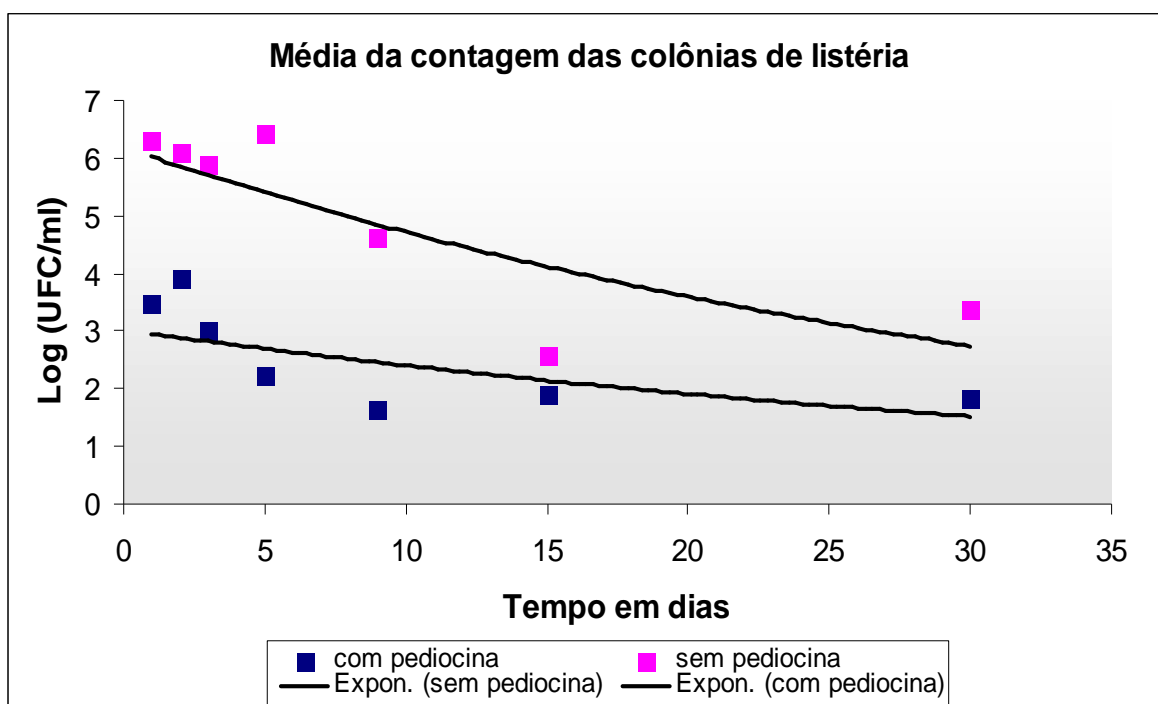
	Amostras			
	Com 1% de pediocina		Sem pediocina	
Tempo	Log de UFC x g <sup>-1</sup>		Log de UFC x g <sup>-1</sup>	
Tempo 1 (4 h)	3,61		8,21	
	2,73		5,32	
	4,07		5,40	
	X e S	3,47   0,68	6,31   1,65	
Tempo 2 (1 dia)	4,35		6,45	
	3,64		4,91	
	3,70		6,96	
	X e S	3,90   0,39	6,11   1,07	
Tempo 3 (2 dias)	3,77		7,00	
	3,22		5,16	
	2,10		5,51	
	X e S	3,03   0,85	5,89   0,98	
Tempo 4 (4 dias)	3,52		9,00	
	1,00		4,80	
	2,10		5,51	
	X e S	2,21   1,26	6,44   2,25	
Tempo 5 (8 dias)	2,65		6,47	
	1,00		4,25	
	1,33		3,20	
	X e S	1,66   0,87	4,64   1,67	
Tempo 6 (15 dias)	3,67		4,49	
	1,00		1,00	
	1,00		2,30	
	X e S	1,89   1,54	2,60   1,76	
Tempo 7 (30 dias)	3,46		5,82	
	1,00		1,00	
	1,00		3,30	
	X e S	1,82   1,42	3,37   2,41	

**Quadro 6** - Contagens, médias e desvios, em valores logarítmicos, de *Listeria monocytogenes* na lingüiça frescal adicionada com pediocina e da amostra controle, sem a adição da pediocina.

As contagens iniciais atingiram, em média, no primeiro tempo valores na ordem de 6,31 log de unidades formadoras de colônias por grama. Estes são aproximadamente o dobro dos valores encontrados em produtos comerciais. Este nível alto de contaminação ajudou a se observar a rápida ação da pediocina e seu potente efeito antilisterial. Nos tempos 5, 6 e 7 a contagem inicial de *Listeria* apresentou uma redução devido a interações ocorridas na amostra durante o tempo de armazenamento, mantendo-se ainda assim em

níveis elevados. Nestes tempos a redução foi menor do que nos tempos 1, 2, 3 e 4, mas atingindo um nível que garantiria a segurança em um produto comercial.

As médias dos resultados obtidos nas análises microbiológicas, em meio seletivo (PALCAM) para *Listeria monocytogenes*, esta representadas graficamente na Figura 10. A Figura 11 é fotografia das placas após o período de incubação, com as amostras adicionadas de pediocina e a amostra controle, sem a adição de pediocina, para o cultivo de *Listeria monocytogenes* em meio PALCAM.



**Figura 10** – Média dos valores logarítmicos de *Listeria monocytogenes* nas amostras com adição de 1% de pediocina e na amostra controle, sem a adição de pediocina, em função do tempo.

Observa-se nesta figura a diferença entre a contagem de *Listeria monocytogenes* no tratamento com a adição de 1% de pediocina em relação ao controle, sem pediocina. A redução na contagem ocorre já nos primeiros instantes após o tratamento, mantendo uma menor contagem em relação ao controle ao longo do tempo, conforme indicado pela linha de tendência mostrada na Figura 10. Esta tendência já havia sido demonstrada por MURINA,(1996) em outros tipos de produtos nos quais foram aplicadas a pediocina. Na lingüiça frescal tipo Toscana, produzida segundo formulação e processo tecnológico usuais nas indústrias brasileiras, a pediocina também foi efetiva, indicando que não existem

compostos da formulação ou etapas do processamento que diminuam ou eliminem seu efeito sobre a *Listeria* durante o período do teste.



**Figura 11** - Fotografia das placas após o período de incubação, com as amostras adicionadas de pediocina e a amostra controle, sem a adição de pediocina, para o cultivo de *Listeria monocytogenes* em meio PALCAM.

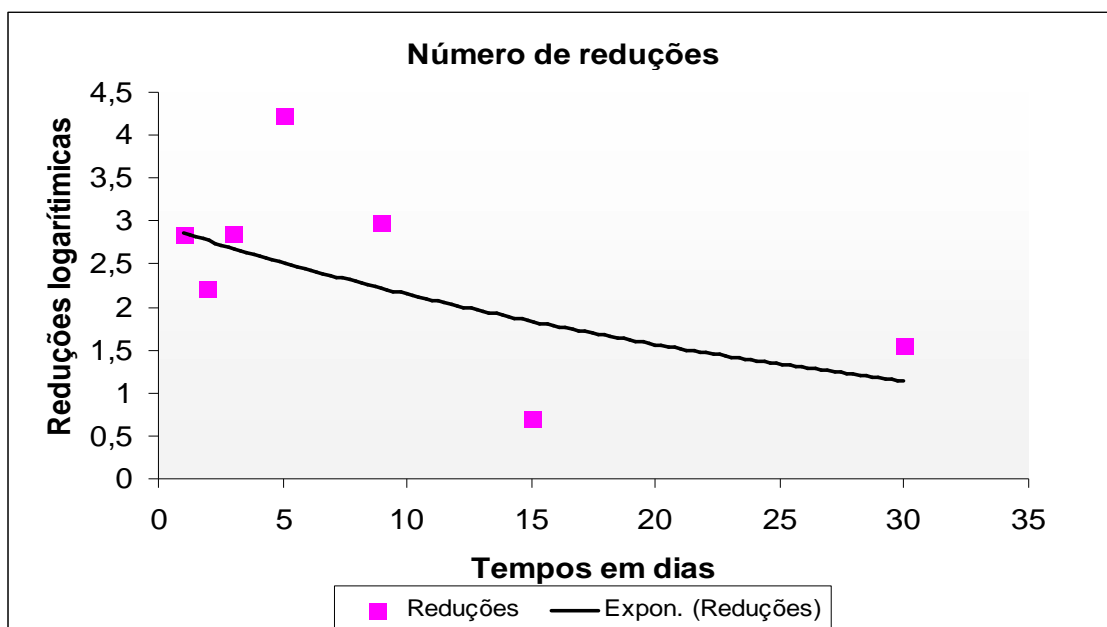
A Figura 11 mostra, na primeira linha, o meio escurecido em todas as diluições, correspondente às placas que foram inoculadas com as amostras sem adição de pediocina. Nas demais linhas as placas apresentam colônias, com escurecimento do meio, até a terceira coluna (diluição de 1000 vezes). Nas demais colunas as placas não apresentam formação de colônias. Nestas placas da segunda, terceira e quarta linhas foram cultivadas as amostras com adição de pediocina.

O Quadro 7 mostra que, em média, o número de reduções provocadas pelo tratamento foi de 2,5 ciclos logarítmicos. No entanto, um aumento nos valores de reduções decimais foram encontradas entre o 3º e o 5º tempos.

	Reduções
Tempo	Log de UFC x g <sup>-1</sup>
1 (4 h)	2,84
2 (1 dia)	2,21
3 (2 dias)	2,86
4 (4 dias)	4,23
5 (8 dias)	2,98
6 (15 dias)	0,71
7 (30 dias)	1,55
Média	2,48

**Quadro 7** - Número de reduções logarítmicas a cada tempo de contagem.

A Figura 12 representa graficamente o número de reduções logarítmicas das unidades formadoras de colônias de *Listeria* durante o período do teste.



**Figura 12** - Número de reduções decimais (RD) para *Listeria monocytogenes* nas amostras com a adição de 1% de pediocina em relação amostra controle, sem a adição de pediocina.

A aplicação da análise de variância aos resultados, indicou que existe diferença entre os tratamentos “com” e “sem” pediocina, em nível de significância de 1%, indicando a eficácia da adição de pediocina em reduzir a quantidade de *Listeria monocytogenes* na massa de lingüiça, ao longo do tempo. A seguir é apresentado o Quadro 8 com resumo do estudo da variância entre os resultados obtidos.

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Tratamento (2)	1	78,75	78,75	24,538	4,08* - 7,31* *
Resíduo	40	128,37	3,21		
Total (42)	41	207,12			

**Quadro 8** – Quadro para análise das fontes de variações comparando, através do valor F, a influência dos tratamentos e do resíduo nos resultados observados.

### 5.3. Avaliação da sobrevivência de bactérias aeróbias mesófilas

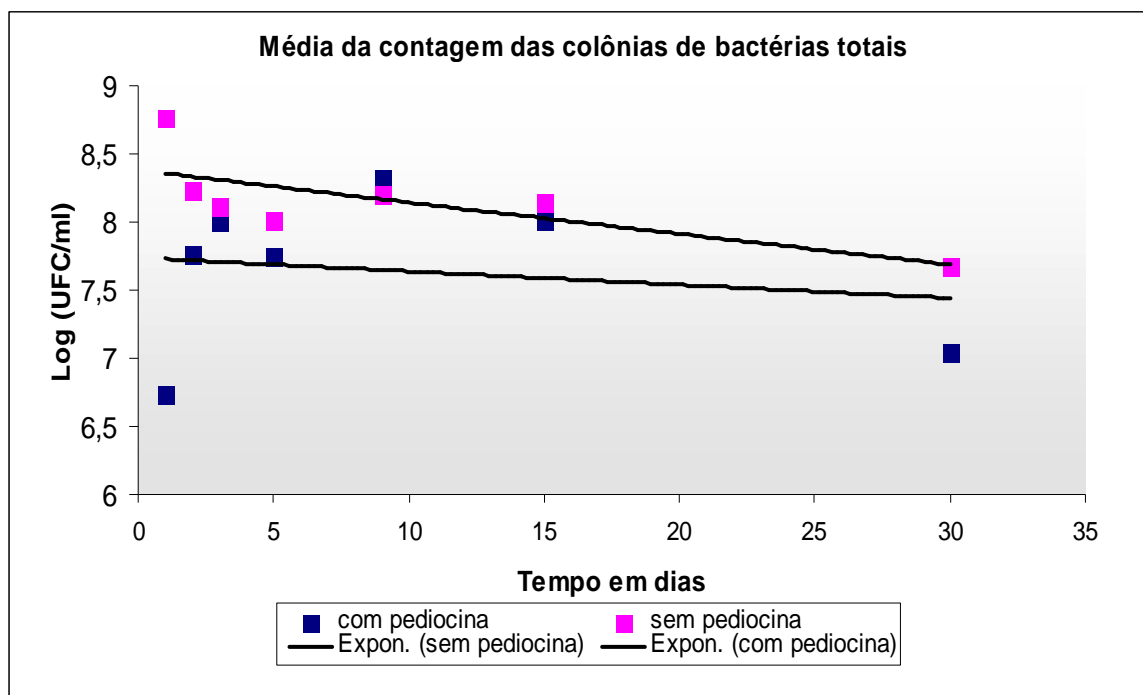
Os dados das contagens as médias e os desvios padrão das contagens, em valores logarítmicos, de bactérias aeróbias mesófilas na lingüiça frescal adicionada com pediocina e da amostra controle, sem a adição da pediocina, com as respectivas repetições, são apresentados no Quadro 9.

	Tratamentos			
	Com 1% de pediocina		Sem pediocina	
Tempo	Log de UFC x g <sup>-1</sup>		Log de UFC x g <sup>-1</sup>	
Tempo 1 (4 h)	5,66		10,18	
	7,27		8,06	
	7,27		8,06	
X e S	6,73	0,93	8,77	1,2
Tempo 2 (1 dia)	5,74		7,55	
	8,79		8,57	
	8,79		8,57	
S	7,77	1,76	8,23	0,58
Tempo 3 (2 dias)	7,28		7,66	
	7,93		8,13	
	8,79		8,57	
X e S	8,00	0,76	8,12	0,45
Tempo 4 (4 dias)	7,24		9	
	8,01		7,53	
	8,01		7,53	
X e S	7,75	0,44	8,02	0,85
Tempo 5 (8 dias)	7,82		7,73	
	8,59		8,44	
	8,59		8,44	
X e S	8,33	0,44	8,20	0,41
Tempo 6 (15 dias)	7,70		7,70	
	8,18		8,37	
	8,18		8,37	
X e S	8,02	0,277	8,15	0,387
Tempo 7 (30 dias)	5,16		7,14	
	8,00		7,94	
	8,00		7,94	
X e S	7,05	1,64	7,67	0,46

**Quadro 9** - Contagens, médias e desvios, em valores logarítmicos, de bactérias aeróbias mesófilas na lingüiça frescal adicionada com pediocina e da amostra controle, sem a adição da pediocina.

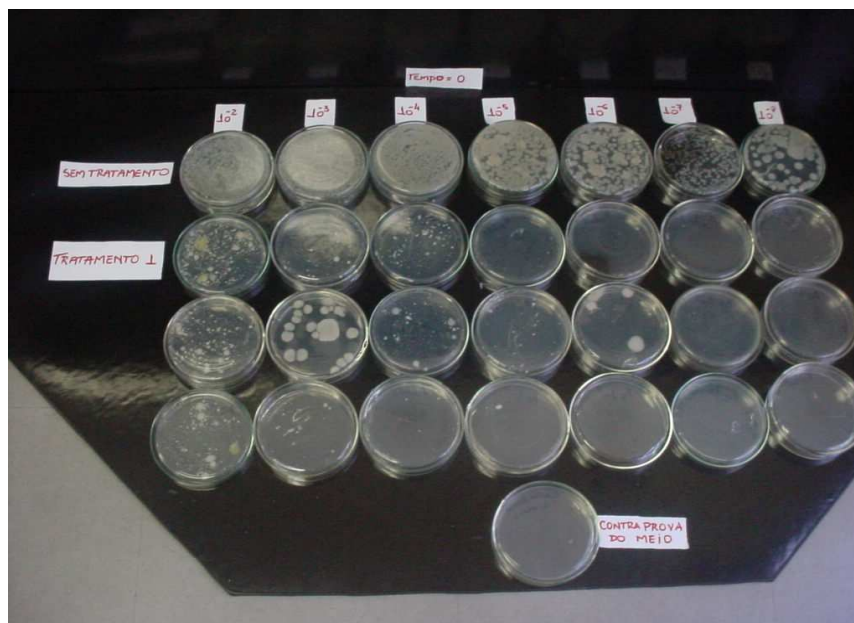


A média dos resultados obtidos nas análises microbiológicas, em meio para contagem padrão em placas para bactéria aeróbias mesófilas, está representada graficamente na Figura 13. A Figura 14 é fotografia das placas após o período de incubação, com as amostras adicionadas de pediocina e a amostra controle, sem a adição de pediocina, para o cultivo de bactérias totais.



**Figura 13** – Média dos valores logarítmicos de bactérias aeróbias mesófilas nas amostras com adição de 1% de pediocina e na amostra controle, sem a adição de pediocina, em função do tempo.

Observa-se nesta figura que a pediocina, em um primeiro momento (tempo 1), agiu sobre a contagem total das bactérias, reduzindo uma população com características semelhantes as das *listerias* (Gram positivas). Entretanto esta redução não foi percebida nos demais tempos. A comunidade voltou a crescer e as contagens de bactérias totais nas amostras com adição de pediocina e na amostra controle, sem adição de pediocina, apresentaram contagens muito próximas.



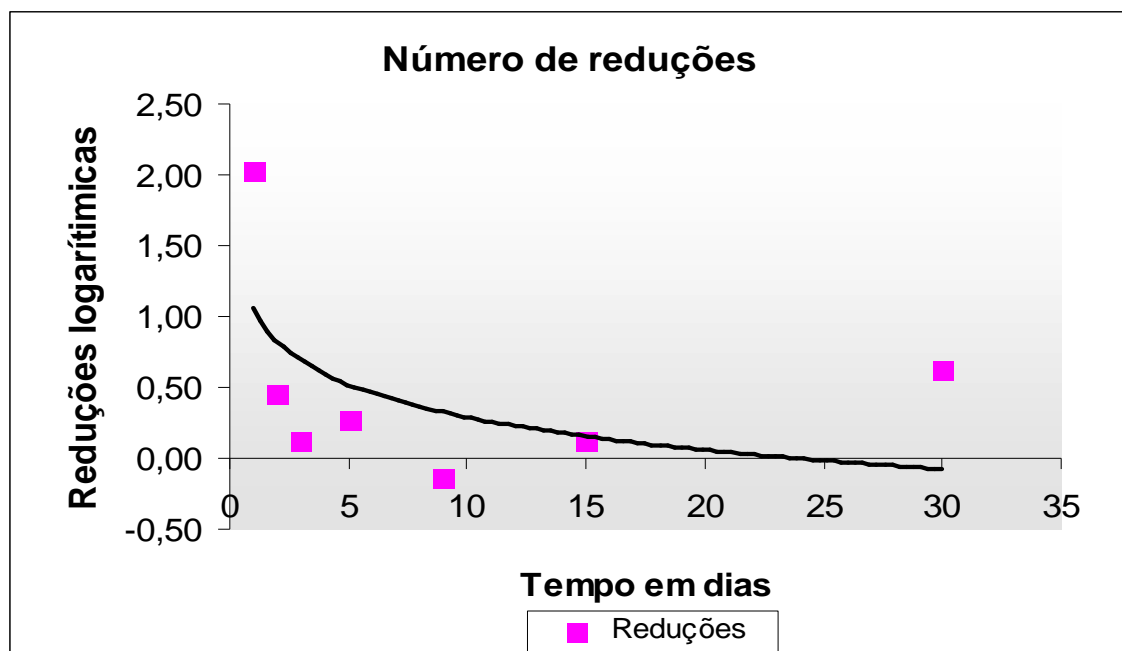
**Figura 14** - Fotografia das placas após o período de incubação, com as amostras adicionadas de pediocina e a amostra controle, sem a adição de pediocina, para o cultivo bactérias aeróbias mesófilas em meio PCA.

Pode-se observar pelo Quadro 10 que a redução na contagem no tempo 1 foi de aproximadamente dois ciclos logarítmicos, porém, nos demais tempos esta redução teve média de meio ciclo logarítmico.

	Reduções
Tempo	Log de UFC x g <sup>-1</sup>
1 (4 h)	2,03
2 (1 dia)	0,46
3 (2 dias)	0,12
4 (4 dias)	0,27
5 (8 dias)	-0,13
6 (15 dias)	0,13
7 (30 dias)	0,62
Média	0,50

**Quadro 10** - Número de reduções logarítmicas a cada tempo de contagem.

A Figura 15 representa graficamente o número de reduções logarítmicas das unidades formadoras de colônias de bactérias aeróbias mesófilas durante o período do teste.



**Figura 15** - Número de reduções decimais (RD) para bactérias totais nas amostras com a adição de 1% de pediocina em relação amostra controle, sem a adição de pediocina.

Aplicando-se aos resultados encontrados nas amostras com tratamento e sem tratamento o estudo da variância verifica-se que aceitamos a hipótese da nulidade  $H_0$ , ou seja, o tratamento com 1% de pediocina adicionado a massa de lingüiça frescal tipo Toscana e o controle, sem adição de pediocina não diferem para bactérias aeróbias mesófilas. A seguir é apresentado o Quadro 11 com resumo do estudo da variância entre os resultados obtidos.

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Treatmento (2)	1	190,94	190,94	0,295	4,08* - 7,31**
Resíduo	40	25912,39	647,81		
Total (42)	41	26103,32			

**Quadro 11** – Quadro para análise das fontes de variações comparando, através do valor F, a influência dos tratamentos e do resíduo nos resultados observados.

## 6. CONCLUSÕES

A adição de 1% de pediocina, usada no experimento, à massa de lingüiça frescal contribui para a diminuição da carga microbiana de *Listeria monocytogenes* atingindo reduções média de 2,5 ciclos logarítmicos nos primeiros 8 dias de armazenamento da carne. Os resultados indicaram também que a pediocina testada e na concentração empregada não foi eficiente no controle do crescimento de bactérias totais. A pediocina testada pode ser empregada como forma de conservar lingüiça frescal tipo Toscana, sendo aplicada diretamente a massa, na razão de 1%, visando o controle de *Listeria monocytogenes* e contribuindo para o aumento da segurança do alimento.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ABIA - Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos. **Indústria da Alimentação: principais indicadores econômicos**. São Paulo: ABIA. Disponível em:

< <http://www.abia.gov.br> >. Acesso em: 17 /abr./ 2007.

ABIPECS – Associação Brasileira de Produção e Exportação de Carne Suína.

**Participação do Brasil perante a produção mundial de carne**. São Paulo: ABIPECS, 2005. Disponível em: < [http://www.abipecs.com.br/foco\\_45.pdf](http://www.abipecs.com.br/foco_45.pdf)>. Acesso em: 12/ set./ 2005.

BAHK, J.; MARTH, E. H. **Listeriosis and Listeria monocytogenes**. In: \_\_\_\_\_. Cliver, DO ed. Foodborne Diseases, p. 247-257, 1990.

BRASIL, Instrução Normativa Nº 4, de 31 de março de 2000. Brasília, DF: Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 2000. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>> Acesso em: 17 / jul./ 2007.

BRASIL, Resolução Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Brasília DF: Secretaria da Agência de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Disponível em : <<http://200.214.130.38/saudelegis>>. Acesso em: 17 / jul./2007.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Chicago, v.50, n. 1-2, p.131-149, 1999.

CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications: comprehensive rev. **Journal Food Science**, Chicago , v. 2, p. 82-100, 2003.

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Chicago, v.71, p.1-20, 2001.

DE MARTINS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of listeria monocytogenes in a pork by a lactobacillus sake strain. **International Journal of Food Microbiology** Chicago, v.42, n.1-2, p. 119-126, 1998.

DOYLE, M.E. **Literature survey of the various techniques used in Listeria intervention: use of bacteriocins to control listeria in meat**. Food Research Institute, University of Wisconsin- Madison, p. 9-11, 1999. Disponível em: <<http://www.wisc.edu/fri/briefs.htm> > . Acesso em: 06 fev. 2005.

FAO/WHO. World Health Organization: **Foodborne disease**. Disponível em:  
< [http://www.who.int/foodsafety/foodborne\\_disease/en/](http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/en/) >. Acesso em 22 abr. 2005

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes* a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Ottawa, v 55, n.3, p. 476- 511, 1991.

FDA- U.S Food and Drug Administration- **Center for Food Safety and Applied Nutrition**. Disponível em:<<http://www.vf.cfsan.fda.gov>>. Acesso em: 25 jul. 2005.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: ESALQ, 990, 467 p.

GIOVA, A .T. **APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos: análises de perigos e pontos críticos de controle para garantir a qualidade e segurança microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 377 p, 1997.

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

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Revista FEMS Microbiology**, Chicago, v.12, p.36-86, 1993.

LOUGUERCIO, A.P. et al. *Listeria monocytogenes* patógeno de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo , v.15, n 80, p.39, 2001.

MEAD, P. S. et al. Food-related illness and death in United States. *Emerging Infectious Diseases*. Atlanta, v.5, n.5, set. 1999. Disponível em:  
<<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no5/mead.htm>>. Acesso em: 15 /set./ 2005

MELO, N.R et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de filmes incorporados com lactato de sódio em salsichas embaladas a vácuo. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, 2002, Curitiba, **Anais ... CBCTA**, 2002.

MING, X. et al. Bacteriocins applied to food packaging materials to Inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, n. 2, p.413-415, 1997.

MONTVILLE, T.J.; WINKOWSKI, K. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. Washington: ASM, cap. 30, 1977

MURINA, P.M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal of Food Protection**, Iowa, 1996. , p.54-63. Supplement.

NATRAJAN, N.; SHELDON, B. W. Inhibition of Salmonella on poultry skin using protein and polysaccharide-based films containing a nisin formulation. **Journal of Food Protection**. Iowa, v.63, n.9, p.1268-1272, 2000.

OPHS. Office of Public Health and Science. **Office of Disease Prevention and Health Promotion**. Disponível em:< <http://odphp.osophs.dhhs.gov/>>. Acesso em 12 jul. 2005.

PADHYE, N. V. e DOYLE, M. P. Escherichia coli O157:H7: epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. **Journal of Food Protection**, Iowa , v. 55, n..7, p.555-565. 1992.

PARDI, M.C .et al. **Ciência,higiene e tecnologia da carne** . Goiânia: CEGRAF-UFG / Niterói: EDUFF, 1993, 586 p.

SARANTÓPOULOS, C. G. L et al. Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis. Campinas: CETEA, 2001. 213 p.

SEELIGER, H.P.R.;JONES,D. Genus *listeria* In: SNEATH,P.H.A.; MAIR,N.S.; SHAPE, M.E. Bergey'S Manual of Sistematic Bacterology. 9 ed. Baltimore:Wilians&Wilkins, 1986,v.2,p.1235-1245.

SILVA,W.P.et al. Listeria spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil; *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.3, p.911, mai-jun. 2004.

VINGOLO, G. et al. Control of listeria monocytogenes in ground beef by lactocin 705, a bacteriocin produced by lactobacillus casei CLR 705. *International Journal of Food Microbiology*, Chicago, v.29, n. 2-3, p. 397-402, 1996.

VINGOLO, G. et al. Effects of curing aditives on the control os Listeria monocytogenes by lactocin 705 in meat slurry. *International Journal of Food Microbiology*, Chicago, v.15, n.3, p. 259-264, 1998.

## 8. ANEXO

### 8.1. Resumo dos resultados das análises microbiológicas a cada repetição dos testes.

Repetição 1( novembro e dezembro de 2005)				
<b>Tempo</b>	<b>AMOSTRA 1</b>	<b>AMOSTRA 2</b>	<b>AMOSTRA 3</b>	<b>CONTROLE</b>
1	5,74	5,73	5,51	10,18
2	5,43	6,98	4,80	7,55
3	7,40	7,08	7,37	7,66
4	7,65	7,14	6,92	9,00
5	8,00	7,49	7,96	7,73
6	8,28	7,81	7,00	7,70
7	5,48	5,00	5,00	7,41

Repetição 2 ( janeiro e fevereiro de 2006)				
<b>Tempo</b>	<b>AMOSTRA 1</b>	<b>AMOSTRA 2</b>	<b>AMOSTRA 3</b>	<b>CONTROLE</b>
1	7,32	7,22	7,28	8,06
2	8,53	8,49	9,35	8,57
3	8,10	7,65	8,05	8,13
4	7,83	8,26	7,95	7,53
5	8,54	8,56	8,67	8,44
6	8,20	8,18	8,15	8,37
7	8,29	7,82	7,88	7,94

Repetição 3 (março e abril de 2006)				
<b>Tempo</b>	<b>AMOSTRA 1</b>	<b>AMOSTRA 2</b>	<b>AMOSTRA 3</b>	<b>CONTROLE</b>
1	7,32	7,22	7,28	8,06
2	8,53	8,49	9,35	8,57
3	8,10	7,65	8,05	8,13
4	7,83	8,26	7,95	7,53
5	8,54	8,56	8,67	8,44
6	8,20	8,18	8,15	8,37
7	8,29	7,82	7,88	7,94

**Quadro 12** - Valores logarítmicos para contagem de *Listeria monocytoges* nas amostras com a adição de pediocina e na amostra controle, sem adição de pediocina.



Repetição 1( novembro e dezembro de 2005)				
<i>Tempo</i>	<i>AMOSTRA 1</i>	<i>AMOSTRA 2</i>	<i>AMOSTRA 3</i>	<i>CONTROLE</i>
1	5,74	5,73	5,51	10,18
2	5,43	6,98	4,80	7,55
3	7,40	7,08	7,37	7,66
4	7,65	7,14	6,92	9,00
5	8,00	7,49	7,96	7,73
6	8,28	7,81	7,00	7,70
7	5,48	5,00	5,00	7,41

Repetição 2 ( janeiro e fevereiro de 2006)				
<i>Tempo</i>	<i>AMOSTRA 1</i>	<i>AMOSTRA 2</i>	<i>AMOSTRA 3</i>	<i>CONTROLE</i>
1	7,32	7,22	7,28	8,06
2	8,53	8,49	9,35	8,57
3	8,10	7,65	8,05	8,13
4	7,83	8,26	7,95	7,53
5	8,54	8,56	8,67	8,44
6	8,20	8,18	8,15	8,37
7	8,29	7,82	7,88	7,94

Repetição 3 (março e abril de 2006)				
<i>Tempo</i>	<i>AMOSTRA 1</i>	<i>AMOSTRA 2</i>	<i>AMOSTRA 3</i>	<i>CONTROLE</i>
1	7,32	7,22	7,28	8,06
2	8,53	8,49	9,35	8,57
3	8,10	7,65	8,05	8,13
4	7,83	8,26	7,95	7,53
5	8,54	8,56	8,67	8,44
6	8,20	8,18	8,15	8,37
7	8,29	7,82	7,88	7,94

**Quadro 13** - Valores logarítmicos para contagem de bactérias mesófilas nas amostras com a adição de pediocina e na amostra controle, sem adição de pediocina.

## 8.2. Avaliação estatística dos resultados.

Para a avaliação estatística dois resultados foi aplicado o estudo da variância a um modelo de experimento inteiramente casualizado. No ensaio inteiramente casualizado o modelo matemático aplicado é:

$$Y_{ij} = M + T_i + E_{ij}$$

$Y_{ij}$  é o valor observado relativo a parcela  $j$  submetida ao tratamento  $i$ ,

$M$  é a média geral de todas as parcelas,

$T_i$  é o efeito do tratamento

$E_{ij}$  é a contribuição do acaso

As hipóteses testadas no experimento foram as seguintes:

$H_0 \Rightarrow$  Os tratamentos com pediocina e sem pediocina são equivalentes.

$H_1 \Rightarrow$  Os tratamentos com pediocina e sem pediocina não são equivalentes.

Admitindo-se a hipótese de nulidade ( $H_0$ ), sabemos que a variância causada nas observações devido aos tratamentos e a variância causada nas observações devido ao resíduo (acaso e fontes de variações não controladas) não deveriam diferir a não ser por acaso. Para compará-las usamos o teste F. As tabelas de F dão valores para o níveis de 5% e 1% de probabilidade. Isto quer dizer que quando F calculado é menor que F tabelado há uma possibilidade de 95% ou 99% da causa da variância ser atribuída ao acaso e não ao tratamento.

A seguir é apresentado o quadro com os valores logarítmicos da quantidade de unidades formadoras de colônias de *Listeria* observados nas parcelas experimentais devido aos tratamentos com pediocina e sem pediocina nas 21 repetições ( $N = 42$ ) repetições para cada tratamento e os cálculos da soma dos quadrados dos tratamentos.

Tempo	Tratamentos		
	Com pediocina	Sem pediocina	
Tempo 1	3,61	8,21	
	2,73	5,32	
	4,07	5,4	
Tempo 2	4,35	6,45	
	3,64	4,91	
	3,7	6,96	
Tempo 3	3,77	7	
	3,22	5,16	
	2,1	5,51	
Tempo 4	3,52	9	
	1	4,8	
	2,1	5,51	
Tempo 5	2,65	6,47	
	1	4,25	
	1,33	3,2	
Tempo 6	3,67	4,49	
	1	1	
	1	2,3	
Tempo 7	3,46	5,82	
	1	1	
	1	3,3	
Totais dos tratamentos	53,92	92,53	
Quadrados dos tratamentos	2907,37	8561,80	11469,17

**Quadro 14** - Valores logarítmicos para contagem de listérias nas amostras com a adição de pediocina e na amostra controle, sem adição de pediocina.

Cálculo da soma dos quadrados e da soma total das observações:

Soma dos Quadrados (SQ)		Total Geral (G)	
13,03	67,40	3,61	8,21
7,45	28,30	2,73	5,32
16,56	29,16	4,07	5,4
18,92	41,60	4,35	6,45
13,25	24,11	3,64	4,91
13,69	48,44	3,7	6,96
14,21	49,00	3,77	7
10,37	26,63	3,22	5,16
4,41	30,36	2,1	5,51
12,39	81,00	3,52	9
1,00	23,04	1	4,8
4,41	30,36	2,1	5,51
7,02	41,86	2,65	6,47
1,00	18,06	1	4,25
1,77	10,24	1,33	3,2
13,47	20,16	3,67	4,49
1,00	1,00	1	1
1,00	5,29	1	2,3
11,97	33,87	3,46	5,82
1,00	1,00	1	1
1,00	10,89	1	3,3
SQ=	674,52	G=	140,11

**Quadro 15** – Soma total dos valores dos quadrados dos logarítmicos (SQ) e soma total dos valores dos logarítmicos (G) para contagem de listérias nas amostras com a adição de pediocina e na amostra controle, sem adição de pediocina.

Cálculo do fator de correção (C):

O fator de correção é calculado dividindo-se o quadrado da soma total dos valores das observações ( $G^2$ ) pelo número de observações (N)

$$C = G^2 / N$$

$$G^2 = 19630,8$$

$$\text{Número total de observações } N = 42$$

$$C = 467,40$$

Cálculo da soma total dos quadrados:

A soma total dos quadrados é dada pela subtração do fator de correção (C) da soma total dos valores dos quadrados dos logarítmicos das observações (SQ).

$$SQ \text{ Total} = SQ - C$$

$$SQ = 674,52$$

$$C = 467,40$$

$$SQ \text{ Total} = 207,12$$

Cálculo da soma dos quadrados dos tratamentos:

A soma dos quadrados dos tratamentos é dada pela média aritmética da soma dos quadrados dos totais de cada tratamento subtraído do fator de correção (C).

$$SQ \text{ Tratamentos} = 1/21(53,92^2 + 92,53^2) - C$$

$$C = 467,40$$

$$SQ \text{ Tratamento} = 78,75$$

Cálculo da soma do quadrado do resíduo:

A soma do quadrado do resíduo é dada pela diferença entre a soma total dos quadrados (SQ Total) e a soma dos quadrados dos tratamentos (SQ Tratamentos).

$$SQ \text{ Resíduo} = SQ \text{ total} - SQ \text{ Tratamento}$$

$$SQ \text{ total} = 207,12$$

$$SQ \text{ Tratamento} = 78,75$$

$$SQ \text{ Resíduo} = 128,37$$

Análise das fontes de variações:

A análise das fontes de variações é feita comparando-se o quadrado médio (soma de quadrados dividido pelos graus de liberdade) dos tratamentos com o quadrado médio do resíduo.

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Tratamento (2)	1	78,75	78,75	24,538	4,08* - 7,31**
Resíduo	40	128,37	3,21		
Total (42)	41	207,12			

**Quadro 16** – Quadro para análise das fontes de variações comparando , através do valor F, a influência dos tratamentos e do resíduo nos resultados observados.

Foi encontrado um valor de F calculado superior ao de F tabelado, logo existe diferença significativa entre os tratamentos a um nível de 1% de significância. Concluímos então que os tratamentos pediocina e sem pediocina não são equivalentes frente ao microorganismo *listeria*, portanto rejeitamos a hipótese  $H_0$  e aceitamos a hipótese  $H_1$ .

O mesmo procedimento foi adotado para se analisar os resultados observados com as contagens de bactérias aeróbias mesófilas. A seguir é apresentado o quadro com os valores logarítmicos da quantidade de unidades formadoras de colônias de bactérias totais observados nas parcelas experimentais devido aos tratamentos.

Tempo	Tratamentos		
	Com pediocina	Sem pediocina	
Tempo 1	5,66	10,18	
	7,27	8,06	
	7,27	8,06	
Tempo 2	5,74	7,55	
	8,79	8,57	
	8,79	8,57	
Tempo 3	7,28	7,66	
	7,93	8,13	
	8,79	8,57	
Tempo 4	7,24	9	
	8,01	7,53	
	8,01	7,53	
Tempo 5	7,82	7,73	
	8,59	8,44	
	8,59	8,44	
Tempo 6	7,7	7,7	
	8,18	8,37	
	8,18	8,37	
Tempo 7	5,16	7,14	
	8	7,94	
	8	7,94	
Totais dos tratamentos	161	153,24	
Quadrados dos tratamentos	25921,00	23482,50	49403,50

**Quadro 17** - Valores logarítmicos para contagem de bactérias aeróbias mesófilas nas amostras com a adição de pediocina e na amostra controle, sem adição de pediocina.

Cálculo da soma dos quadrados e da soma total das observações:

Soma dos Quadrados (SQ)		Total Geral (G)	
32,04	103,6324	5,66	10,18
52,85	64,9636	7,27	8,06
52,85	64,9636	7,27	8,06
32,95	57,0025	5,74	7,55
77,26	73,4449	8,79	8,57
77,26	73,4449	8,79	8,57
53,00	58,6756	7,28	7,66
62,88	66,0969	7,93	8,13
77,26	73,4449	8,79	8,57
52,42	81	7,24	9
64,16	56,7009	8,01	7,53
64,16	56,7009	8,01	7,53
61,15	59,7529	7,82	7,73
73,79	71,2336	8,59	8,44
73,79	71,2336	8,59	8,44
59,29	59,29	7,7	7,7
66,91	70,0569	8,18	8,37
26,63	70,0569	8,18	8,37
64,00	50,9796	5,16	7,14
64,00	63,0436	8	7,94
25921,00	63,0436	8	7,94
SQ= 28264,94		G= 301,31	

**Quadro 18** – Soma total dos valores dos quadrados dos logarítmicos (SQ) e soma total dos valores dos logaritmos (G) para contagem de bactérias aeróbias mesófilas nas amostras com a adição de pediocina e na amostra controle, sem adição de pediocina.



Cálculo do fator de correção (C):

O fator de correção é calculado dividindo-se o quadrado da soma total dos valores das observações ( $G^2$ ) pelo número de observações (N)

$$C = G^2 / N$$

$$G^2 = 90787,7$$

Número total de observações  $N = 42$

$$C = 2161,61$$

Cálculo da soma total dos quadrados:

A soma total dos quadrados é dada pela subtração do fator de correção (C) da soma total dos valores dos quadrados dos logarítmicos das observações (SQ).

$$SQ \text{ Total} = SQ - C$$

$$SQ = 26103,32$$

$$C = 2161,61$$

$$SQ \text{ Total} = 26103,32$$

Cálculo da soma dos quadrados dos tratamentos:

A soma dos quadrados dos tratamentos é dada pela média aritmética da soma dos quadrados dos totais de cada tratamento subtraído do fator de correção (C).

$$SQ \text{ Tratamentos} = 1/21(161^2 + 153,24^2) - C$$

$$C = 2161,61$$

$$SQ \text{ Tratamento} = 190,94$$

Cálculo da soma do quadrado do resíduo:

A soma do quadrado do resíduo é dada pela diferença entre a soma total dos quadrados (SQ Total) e a soma dos quadrados dos tratamentos (SQ Tratamentos).

$$SQ \text{ Resíduo} = SQ \text{ total} - SQ \text{ Tratamento}$$

$$SQ \text{ total} = 26103,32$$

$$SQ \text{ Tratamento} = 190,94$$

$$SQ \text{ Resíduo} = 25912,39$$

Análise das fontes de variações:

A análise das fontes de variações é feita comparando-se o quadrado médio (soma de quadrados dividido pelos graus de liberdade) dos tratamentos com o quadrado médio do resíduo.

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Tratamento (2)	1	190,94	190,94	0,295	4,08* - 7,31**
Resíduo	40	25912,39	647,81		
Total (42)	41	26103,32			

**Quadro 19** – Quadro para análise das fontes de variações comparando, através do valor F, a influência dos tratamentos e do resíduo nos resultados observados.

Foi encontrado um valor de F calculado inferior ao de F tabelado, logo não existe diferença significativa entre os tratamentos a um nível de 1% de significância para a contagem de bactérias aeróbias mesófilas. Concluímos então que os tratamentos com pediocina e sem pediocina são equivalentes para este grupo de microorganismos, portanto rejeitamos a hipótese  $H_1$  e aceitamos a hipótese  $H_0$ .