

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE
ALIMENTOS**

ANA CAROLINA ZANCAN

**APLICAÇÃO DA BACTERIOCINA NISINA NA
INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

Florianópolis

2022

ANA CAROLINA ZANCAN

**APLICAÇÃO DA BACTERIOCINA NISINA NA
INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

Trabalho de Curso apresentado à disciplina
EQA 5613 como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em Engenharia
de Alimentos pela Universidade Federal de
Santa Catarina.

Enfoque: Teórico

Orientador: Prof. Dr. Cristiano José de Andrade

Florianópolis
2022

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Cristiano José de Andrade, pela oportunidade de aprender, pela orientação e por sua dedicação. Obrigada pela honra de trabalhar e aprender.

À Universidade Federal de Santa Catarina, e ao curso de Engenharia de Alimentos, por ser o âmbito de troca de conhecimento e aprendizado que proporcionou a preparação para este trabalho.

Aos demais professores do curso, por todo o conhecimento transmitido nesses anos de graduação e por estarem sempre dispostos a ensinar a paixão por essa maravilhosa profissão.

Aos meus amigos, em especial Julia; Beatriz; Heloize pela amizade, carinho, parceria e disposição de sempre me apoiarem e acreditarem em mim diante das dificuldades.

A Ana Alice, Vitório, Vitória e Mateus por serem minha fortaleza, meu maior tesouro e pelo apoio. Essa conquista é para vocês, família.

RESUMO

A indústria de alimentos é essencial para garantir a qualidade dos alimentos ao consumidor final. Dessa forma, torna-se necessária a aplicação de métodos que conservem os alimentos, como tratamentos térmicos, bem como a aplicação de produtos químicos. No entanto, idealmente os alimentos processados devem preservar a mesma composição nutrição dos alimentos *in natura*. Assim, há a necessidade de desenvolver alternativas para conservar o alimento de maneira viável e natural. Nesse sentido há a bacteriocina nisina, um peptídeo antimicrobiano produzido por *Lactococcus lactis*. A nisina é a bacteriocina mais utilizada na indústria, visto que é a única aprovada pela organização mundial da saúde (OMS) para uso como conservante de alimentos. Sua aplicação é extensa, e percorre desde aplicação em leites e derivados, carnes e pescados, sucos e embalagens; a usos terapêuticos na saúde, como componente de métodos contraceptivos. Portanto, o objetivo deste trabalho é discorrer sobre a aplicabilidade da nisina como antimicrobiano em diferentes matrizes alimentares. Além de destacar a biossíntese e os mecanismos de ação.

Palavras-chave: nisina, bacteriocina, inibição, matriz alimentar, microrganismo, conservação de alimentos.

ABSTRACT

The food industry is essential to ensure the quality of food to the final consumer. Thus, it is necessary to apply methods that preserve food, such as heat treatments, as well as the application of chemical products. However, ideally processed foods should preserve the same nutritional composition as fresh foods. Thus, there is a need to develop alternatives to preserve food in a viably and *in natural*. In this sense, there is the bacteriocin nisin, an antimicrobial peptide produced by *Lactococcus lactis*, it is the most used bacteriocin in the industry, as it is the only one approved by the World Health Organization (WHO) for use as a preservative. Its application is extensive, and ranges from application in milk and dairy products, meat and fish, juices, and packaging; to therapeutic uses in health, as a component of contraceptive methods. Therefore, the objective of this work is to discuss the applicability of nisin as an antimicrobial in different food matrices. In addition to highlighting the advances in the studies of biosynthesis and mechanisms of action of the bioactive nisin.

Keywords: nisin, bacteriocin, inhibition, food matrix, microorganism, food preservation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
2.1. NISINA	10
2.1.1. Classificação.....	12
2.1.2. Toxicidade.....	13
2.2. ASPECTOS HISTÓRICOS.....	13
3. MECANISMO DE AÇÃO ANTIMICROBIANO DA NISINA	15
4. PRODUÇÃO DE NISINA	19
4.1 DETALHES REFERENTES À PRODUÇÃO DA NISINA	20
4.2 LIOFILIZAÇÃO COMO MÉTODO DE CONSERVAÇÃO DA NISINA.....	22
4.3 APLICAÇÃO DA NISINA NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	23
4.4 APLICAÇÃO DA NISINA NA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS.....	24
4.5 APLICAÇÃO DA NISINA NA INDÚSTRIA CÁRNEA	27
4.6 APLICAÇÃO DA NISINA NA INDÚSTRIA DE MINIMAMENTE PROCESSADOS.....	31
4.7 APLICAÇÃO DA NISINA NA INDÚSTRIA DE PESCADOS.....	35
4.8 APLICAÇÃO TERAPÊUTICA DA NISINA	37
5. CONCLUSÃO	39
6. REFERÊNCIAS	40

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da nisina	11
Figura 2 - Esquema síntese da história da nisina	14
Figura 3 - Mecanismo de ação antimicrobiano da nisina	18
Figura 4 - Modo de ação da nisina	18
Figura 5 - Estratégias comuns de purificação de bacteriocinas	21

LISTA DE TABELAS

TABELAS

Tabela 1 -	Efeito bactericida da nisina sobre diferentes microrganismos e em diversas aplicações.....	16
Tabela 2 -	Estudos da aplicação da nisina em diferentes tipos de queijo	25
Tabela 3 -	Estudos da aplicação da nisina em cárneos.....	28
Tabela 4 -	Estudos da aplicação da nisina em diferentes tipos de produtos minimamente processados.....	32
Tabela 5 -	Estudo da aplicação da nisina em pescados.....	35

1. INTRODUÇÃO

Alimentos se deterioram com facilidade, alterando as características organolépticas, bem como em relação aos nutrientes. Como consequência, há uma redução na vida de prateleira e podem colocar em risco a saúde do comensal. Essa perda é dependente de vários fatores, como a qualidade da matéria prima, as operações de processamento, condições de armazenamento e transporte, entre outras condições. Porém, a principal forma de deterioração dos alimentos é microbiológica (GOMES, 2017).

Portanto, a fim de conservar os alimentos com qualidade e segurança alimentar, é necessário desenvolver alternativas para que, atreladas às tecnologias existentes (desidratação; tratamentos térmicos; congelamento; refrigeração; radiação etc.), possibilitem à indústria disponibilizar alimentos de qualidade microbiológica sem adição em demasia de aditivos alimentares. Neste sentido, como alternativas estão as bacteriocinas, que são substâncias naturais com propriedades bioconservadoras (SCHULZ; BONELLI; BATISTA-GONZÁLEZ *et al.*, 2022; VÁSQUEZ, 2009; REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004; SÁNCHEZ-MARTÍN *et al.*, 2019).

Dentre os microrganismos que são bioconservadores, há as bactérias ácido lácticas (BALs). Essas são capazes de produzir bacteriocinas, proteínas ou peptídeos bacterianos sintetizados nos ribossomos, e que apresentam atividade inibitória contra diversos microrganismos (COPETTI, 2021). Logo, são compostos que possuem alto potencial na preservação de alimentos, ajudando a limitar a adição de conservantes químicos bem como a intensidade dos tratamentos térmicos. Como resultado da sua aplicação, há maior disponibilidade de alimentos naturalmente preservados e ricos em propriedades organolépticas e nutricionais (ZACHAROF, LOVITT, 2012; DE MELO BARROS, 2020).

A principal bacteriocina usada na indústria de alimentos é a nisina, visto que é a única que possui o reconhecimento como aditivo alimentar pela OMS e pela Organização de Alimentos e Agricultura (FAO). Além disso, tem certificado de GRAS “*Generally Regarded as Safe*”, pelo FDA (*Food and Drug Administration*). A nisina é sintetizada pela espécie de BAL *L. lactis*, e possui alto poder bacteriostático ou bactericida sobre certos microrganismos alvos, agindo em especial contra bactérias Gram-positivas e seus esporos. (COTTER; HILL; ROSS, 2005; PAULIELLO, 2021).

A nisina apresenta um amplo espectro de ação de patógenos e pode ser utilizada em diversas matrizes alimentares. São ativas especialmente contra bactérias Gram-positivas, porém, quando são adicionadas, previamente, tratamentos complementares que auxiliem romper a membrana protetora que as bactérias Gram-negativas possuem, a nisina torna-se atuante contra bactérias Gram-negativas. Os métodos mais usados são aplicação de substâncias quelantes; pressão hidrostática; de ultrassom entre outros métodos (FREITAS, 2017).

Além disso, há aplicação da nisina no setor de saúde. Uma vez que apresenta características terapêuticas, especialmente em animais. A nisina pode ser aplicada como aditivo de para garantir a saúde, prevenção, manejo e criação dos animais. É aplicada em doenças animais como a mastite bovina e canina; e como aditivo fármaco odontológico para amenizar o problema da resistência bacteriana, possibilitando o uso de doses menores no tratamento de doenças infecciosas com redução nos custos e na toxicidade, além de ter potencial na prevenção do surgimento das linhagens resistentes (KOPROVSKI, 2021; TROVÃO, 2017; ALVES, 2018). Outra aplicação terapêutica está relacionada ao tratamento alternativo, em humanos, contra a *Propionibacterium acnes* (CEBRIÁN, 2017).

Portanto, o objetivo deste trabalho é detalhar as aplicações da nisina em diversas matrizes alimentares, como carnes; leites e derivados; pescados; biofilmes alimentares, entre outros. Além dos aspectos históricos, produção e mecanismo de ação.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

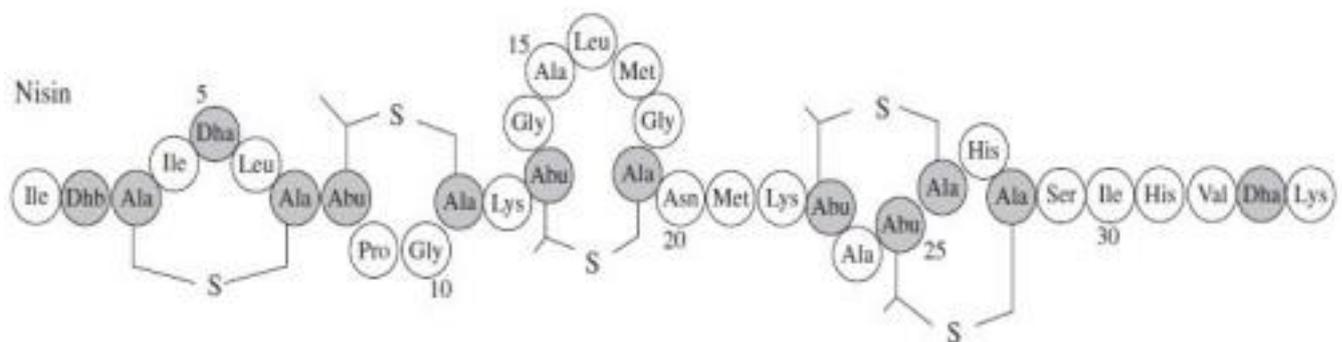
2.1. NISINA

A nisina (Figura 1) é uma bacteriocina, ou seja, é um peptídeo extracelular com propriedades antimicrobianas sintetizados nos ribossomos de diversas cepas dos microrganismos *L. lactis* (SÁNCHEZ-MARTÍN *et al.*, 2019). Esses peptídeos apresentam ações bacteriostática ou bactericida, especificamente em bactérias Gram-positivas, incluindo a esporulação (Vessoni Penna, Moraes e Fajardo, 2002; QUICHABA, 2021), mas também em bactérias Gram-negativas com auxílio de ferramentas que rompem a membrana externa, presente nesses microrganismos, e que atua como barreira impedindo a difusão da bacteriocina até a membrana celular, garantindo acesso à nisina ao seu local de ação (HOOVER, 2003; COTTER; HILL; ROSS, 2005; FREITAS, 2017). Portanto, pode-se verificar que o espectro de

ação da nisina é amplo, e dentre os microrganismos patogênicos, os particularmente sensíveis à ação da nisina são: *Actinomyces* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp., *Listeria* spp. e *Staphylococcus* spp. (CARRIM, 2005; ALVES, 2018).

Conforme Alves (2018) a molécula da nisina é composta por 34 aminoácidos (aa), sendo formada pela deidrobutairina (DHB) e deidroalanina (DHA). Além de quatro ácidos aminobutíricos; oito alaninas; três glicinas; três lisinas e isoleucinas; duas leucinas, metioninas e histidina; uma valina, serina, asparagina, prolina. Há posição desses aminoácidos é que definem qual classe corresponde a variante natural da nisina, e essas pequenas variações conferem características biológicas diferentes apesar da atividade semelhante, como por exemplo melhor aplicabilidade em diferentes matrizes alimentares e microrganismos (BARBOSA *et al.*, 2021).

Figura 1 - Estrutura molecular da nisina.



Fonte: (PIPER *et al.*, 2009).

Inerentemente, há um contínuo interesse da indústria de alimentos em conservadores de alimentos, logo, uma vez que a nisina possui um alto potencial conservador muitos estudos da sua aplicabilidade são realizados. Esse peptídeo tem a capacidade de reduzir, ou até mesmo substituir, a aplicação de conservantes químicos, porém preservando a qualidade sensorial e nutricional do produto (NASCIMENTO; MORENO *et al.*, 1999; ARECHAVALETA, 2020).

Além disso, pode ser virtualmente aplicada em todos os produtos alimentares, pois é termoestável e apresenta amplo espectro de inibição sobre os principais patógenos de alimentos (JULIANA MIHO TANABE, 2021). Outra vantagem que a nisina possui é ser altamente específica sobre estes microrganismos patogênicos, ou seja, ela não afeta probióticos e não modificam a microbiota intestinal humana, pois são digeridas por enzimas como pepsina e tripsina, o que gera um efeito benéfico sobre o produto aumentando sua segurança sem alterar

microrganismos desejáveis a certos produtos alimentares (NASCIMENTO, 2008; ALVES, 2018).

2.1.1. Classificação

Não há consenso quanto aos critérios de classificação das bacteriocinas, elas podem ser agrupadas com base em sua estrutura, como pelo número de aminoácidos que formam sua molécula química ou a partir das suas propriedades físico-químicas; ou então classificadas com base em seu mecanismo de ação (AYMERICH *et al.*, 1996 ; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

De acordo com Klaenhammer (1993) há quatro classes (I; II; III; IV) de bacteriocinas produzidas por BALs. A nisina está presente na Classe I, também conhecida como lantibióticos, e é formada por peptídeos compostos de metil-lantionina, lantionina em sua estrutura, ou seja, pertence a um grupo de antimicrobianos peptídicos catiônicos chamados coletivamente de lantibióticos do tipo I (SHIN *et al.*, 2016; FIELD *et al.*, 2016).

Além disso, a nisina possui cerca de cinco variantes naturais. A variação entre essas classes ocorre em função do posicionamento dos seus aminoácidos. Nisina A e Z diferem apenas pelo posicionamento de um elemento na posição 27, sendo encontrada histidina para A e asparagina para Z. Também são produzidas por espécies de *L. lactis*, assim como a nisina Q e F. Quanto à outra variante, a classificação difere por ser sintetizada por outras bactérias ácido lácticas. Essas pequenas variações conferem características biológicas diferentes apesar da atividade semelhante, como por exemplo melhor aplicabilidade em diferentes matrizes alimentares e microrganismos a depender de pH; difusibilidade; concentração de sólidos e lipídeos. A nisina Z provou maior taxa de difusão e solubilidade em pH neutros (BAHRAMI *et al.*, 2019 ; HAYES, 2019; BARBOSA *et al.*, 2021).

A nisina, assim como todo lantibiótico, deve ser modificada após sua produção para alcançar sua forma ativa (4.1 DETALHES REFERENTES À PRODUÇÃO DA NISINA). Essa classe é subdividida em Ia e Ib. A subclasse Ia, onde se encontra a nisina, é composta dos peptídeos que possuem a principal forma de ação ataque ao microrganismo alvo a formação de poros na membrana citoplasmática (CHAUDHARY 2022).

2.1.2. Toxicidade

Estudos toxicológicos *in vitro* (toxicidade aguda, crônica e subcrônica, resistência cruzada e sensibilidade alérgica) demonstraram que a ingestão da nisina não causa efeitos tóxicos ao organismo humano uma vez que é inativada por enzimas como pepsina e tripsina (ROOMIANI *et al.*, 2017; BATISTA-GONZÁLEZ *et al.*, 2022). Logo, é considerada não tóxica para seres humanos.

Segundo a Organização mundial da saúde, conforme os dados do nível “*no effect*” observado nas avaliações toxicológicas, a Ingestão Diária Aceitável de 33.000 Unidades Internacionais (“*Acceptable Daily Intake*”) representa o valor limite máximo da substância que pode ser ingerida por dia, sem causar danos à saúde do comensal). Isso equivale a cerca de 0,825 mg/kg de massa corpórea (HOOVER; CHEN, 2003; ARIAS, 2019).

Quanto aos estudos de toxicidade realizados em ratos mostram que o valor de dose letal para 50% (LD50) é similar ao de sais comuns, o que significa, cerca de 7g/kg de peso corpóreo (TOLEDO, 2000). Menezes (2013), e Alves (2018) ao avaliarem a influência da ingestão regular em humanos de nisina por seis e oito semanas, respectivamente, verificaram que o consumo regular da nisina melhorou o funcionamento intestinal, e não foram observadas modificações negativas nos parâmetros bioquímicos de voluntários humanos saudáveis, confirmando que a nisina é segura para a saúde humana.

Além disso, é também a única bacteriocina, que foi confirmada como *GRAS*, em 1988, e que possui uso liberado como aditivo alimentar pelo comitê do *Codex Alimentarius*, pela *Federal Food, Drug and Cosmetic Act* (FFDCA) e pelo FDA (Chandrapati e O’Sullivan, 1998). Portanto, a nisina tem o seu uso aprovado em mais de 50 países, sendo que no Brasil é regulamentada pela ANVISA para uso como conservante natural desde 1996 (ALVES, 2018).

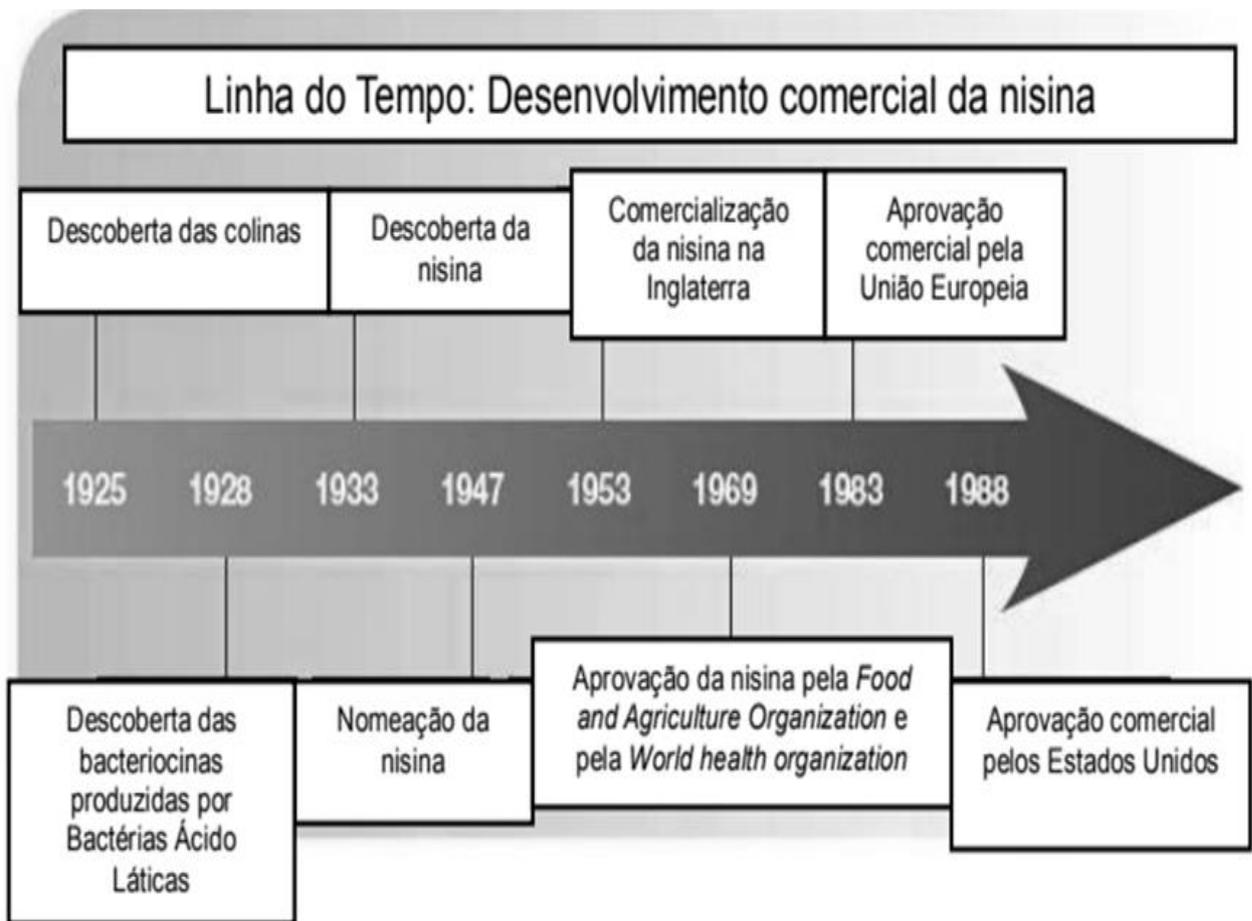
2.2. ASPECTOS HISTÓRICOS

A nisina foi a primeira bacteriocina descoberta, em 1928, na Inglaterra, por Rogers e Whilttier (ROGERS, 1928; FUSIEGER, 2019). Em seguida, Whitegead, em 1933, descreveu as propriedades antimicrobianas do peptídeo nisina (COTTER; HILL; ROSS, 2005; MIRANDA, 2017). Após essas descobertas o interesse na área cresceu rapidamente e conseqüentemente, pesquisas foram desenvolvidas como Mattick e Hirsch (1947) que a concentraram e a nomearam nisina, (MATTICK; HIRSCH; BERRIDGE, 1947) esta possui

esta nomenclatura devido ao termo "*N-inhibitory substances*" (Substâncias inibitórias - NiS) mais o sufixo INA, referente a sua formação por aminoácidos (DAVIES *et al.*, 1998; CLEVELAND *et al.*, 2001; MIRANDA, 2017).

Após cerca de três décadas, Gross e Morell (1971) foram capazes de identificar a estrutura da nisina por meio da clivagem da nisina com brometo de cianogênio a fim de classificar os peptídeos a partir da análise de aminoácidos, classificando-a como peptídeo antimicrobiano que possui em sua estrutura lantionina. Posteriormente, Klaenhammer (1993) definiu-a como lantibiótico da subclasse Ia.

Figura 2 - Esquema síntese da história da nisina.



Fonte: Cotter, 2005.

A nisina é a principal bacteriocina utilizada na indústria de alimentos há cerca de 50 anos como conservante em alimentos, pois foi a única até então aprovada pelos órgãos regulatórios (CLEVELAND *et al.*, 2001; SOUZA; CONTESSA; GONÇALO, 2017). Além disso, a nisina possui aplicabilidade clínica e farmacêutica, uma vez que é usada como alternativa aos antibióticos tradicionais utilizada no tratamento contra doenças de patógenos

microbianos (YANG *et al.*, 2014; HAYES *et al.*, 2019; ALVES, 2018; FURTADO *et al.*, 2018; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015; KOPROVSKI, 2021).

3. MECANISMO DE AÇÃO ANTIMICROBIANO DA NISINA

As bacteriocinas apresentam um mecanismo de ação clássico, ou seja, interagem com receptores da membrana celular da bactéria alvo e a partir da adesão das bacteriocinas na membrana, em especial pela atração com fosfolipídios presentes nessa, ocorre uma agregação dos monômeros da membrana citoplasmática causada devido a dissipação da força próton-motriz (ou seja, a simultânea despolarização gera efluxo de íons como K^+ ; aminoácidos e ATPs), como consequência a modificação no potencial de membrana e no gradiente de concentração de H^+ (CHAUDHARY 2022; DELBONI, 2009; ALVES, 2018).

Essa modificação, em microrganismo, causa a formação de poros na membrana citoplasmática provocando a saída de compostos fundamentais para o funcionamento celular, o que pode acarretar a morte celular (DELBONI, 2009; ALVES, 2018). Ou seja, devido ao alto teor de lipídios aniônicos na membrana plasmática de bactérias Gram positivas, as bacteriocinas interagem por afinidade com as membranas dessas bactérias, causando a abertura de poros e extravasamento de componentes celulares (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015; KOPROVSKI, 2021).

Portanto, sendo a nisina uma bacteriocina, seu processo de ação acompanha o mecanismo tradicional, porém ocorre em duas etapas. Na primeira etapa ocorre a ligação de nisina ao microrganismo alvo, por meio da adsorção não-específica da nisina sobre a parede celular, especificamente no peptídeo II. Esse fenômeno é reversível e dependente do da composição fosfolipídica da membrana do microrganismo alvo, o que garante a assertividade da ação da nisina contra certas espécies de microrganismos; do pH (3,0 - 6,5); da presença e concentração tanto de cátions divalentes (Ca^{+2} e Mg^{+2}) quanto de trivalentes (P^{+3}) (MORENO *et al.*, 1999; KOPROVSKI, 2021; FREITAS, 2017)

Em seguida ocorre a segunda etapa, que é fundamental pois ativa a função bacteriostática da nisina. Nesta etapa, as células sofrem mudanças irreversíveis, pois a bacteriocina torna-se insensível às proteases. Como consequência, a nisina fica altamente atraída aos fosfolipídios na membrana e liga-se a eles, gerando poros (0,5-1,0 nm de raio) na membrana citoplasmática. Dessa forma acontece, a despolarização da membrana o que causa

um rápido efluxo das moléculas essenciais que mantém o funcionamento da célula alvo, como íons K⁺ (que estabilizam a pressão osmótica ótima de funcionamento), aminoácidos (que realizam síntese de compostos essenciais) e ATP (moléculas energéticas). Isso acarreta alterações irreversíveis, que culminam na morte celular (MORENO *et al.*, 1999).

Portanto os principais microrganismos patogênicos sensíveis a esse mecanismo de ação da nisina são: *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. (CARRIM, 2005; BAHRAMI *et al.*, 2019). Conforme o que está apresentado na tabela abaixo que demonstram a ação inibitória da nisina sobre diversos microrganismos.

Tabela 1 - Efeito bactericida da nisina sobre diferentes microrganismos e em diversas aplicações.

Microrganismo	Aplicação
<i>Bacillus</i> spp.	ZHANG, Qiu Qin (2019) e seus colaboradores avaliaram a ação da nisina contra o microrganismo <i>Bacillus subtilis</i> , e a formação do biofilme no artigo “Atividades comparativa das concentrações de extrato de alho, nisina, ε-polilisina e ácido cítrico para ação antibacterianas e contra a formação de biofilme em <i>Bacillus subtilis</i> ”. A concentração de nisina está relacionada ao efeito inibitório, pois foi possível demonstrar que a ação da nisina contra as células vegetativas de <i>Bacillus</i> pode ser bactericida ou bacteriostática, dependendo de sua concentração. Os resultados mostraram que nisina, ε-polilisina e ácido cítrico inibiram completamente o crescimento e a formação de biofilme de <i>B. subtilis</i> em 0,15, 0,09 e 1,5 mg/ml, respectivamente. Entre esses quatro bioconservantes, a ε-polilisina, que causou o colapso celular, apresentou as maiores atividades antibacteriana e antibiofilme, seguida pela nisina.
<i>Clostridium</i> spp. e <i>Escherichia coli</i>	UBAQUE BELTRÁN, Camila Andrea (2020) desenvolveu o estudo “Inclusão de óleo essencial de orégano e nisina encapsulados em biorevestimento comestível de quitosana como alternativa de conservação em carne de hambúrguer bovino”. Neste trabalho foi demonstrado que tanto a nisina quanto o AEO encapsulado apresentam grande capacidade de inibição contra os microrganismos avaliados <i>Clostridium</i> spp. e <i>E. coli</i> .

Portanto, a formulação escolhida para trabalhar foi de 250 UI/ml de nisina, concentração de 2% p/v de quitosana e concentração de 0,50 %v/v de óleo encapsulado. O revestimento prolongou em 5 dias a vida útil da carne de hambúrguer em comparação com a carne de hambúrguer avaliada sem revestimento comestível, pois manteve suas características de qualidade microbiológica, pH e atividade de água ao longo dos 12 dias de avaliação mostrando que os antimicrobianos utilizados nesta pesquisa são uma alternativa para a substituição de aditivos sintéticos como nitratos e nitritos. Além disso, na análise sensorial, os consumidores não encontraram diferenças significativas entre a carne de hambúrguer produzida sem cobertura e a carne de hambúrguer produzida com a cobertura comestível desenvolvida nesta pesquisa.

Listeria ssp.

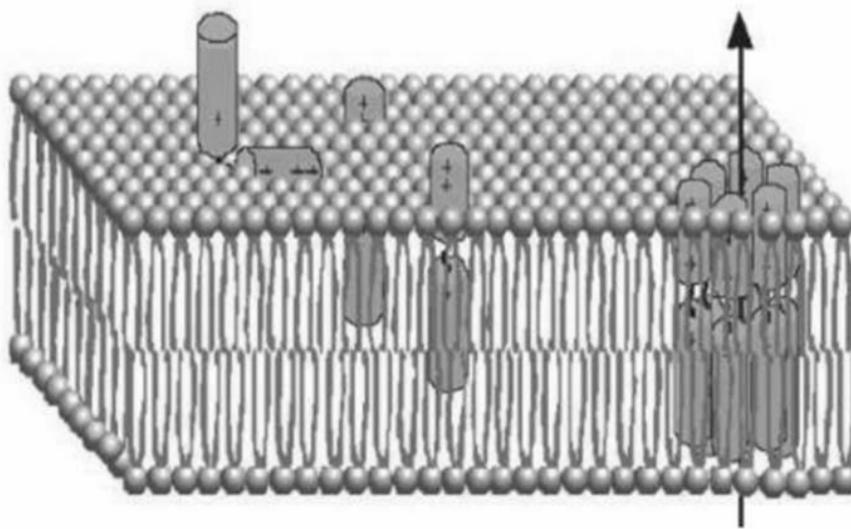
O autor HENDERSON, L. O. (2020) descreveu a eficiência da aplicação da nisina, sobre diferentes pH e temperaturas, no controle de *Listeria* contra diversas cepas de *L. monocytogenes* em um modelo de queijo em escala de laboratório. Observou-se que a nisina é mais eficaz quando o queijo é armazenado em temperaturas mais baixas, e quando é feito em pH mais alto (6 e 6,5), comparado ao queijo feito em pH 5,5. Portanto, no geral, nossos resultados destacam a importância de considerar as condições ambientais específicas de uma matriz alimentar ao desenvolver e aplicar estratégias de intervenção baseadas em nisina contra *L. monocytogenes*, e destacam a importância de uma matéria prima de qualidade e que siga as condições de BPF'S para se obter junto da nisina uma boa vida de prateleira.

Staphylococcus ssp.

KOPROVSKI, Naiara Vitoria Ferreira Cortes (2021) em seu estudo "Atividade *in vitro* da nisina sobre *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina" descreveu a ação terapêutica para fins de cuidados contra a mastite. Essa enfermidade que possui alta prevalência nos rebanhos leiteiros caracteriza-se pela inflamação das glândulas mamárias, sendo o *S. aureus* o patógeno mais frequente causador dessa doença e altamente resistente aos tratamentos convencionais, como alternativa surge a nisina. Foram testadas as habilidades antimicrobiana em 27 cepas de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina foram avaliadas, pode-se afirmar que essa bacteriocina apresenta potencial terapêutico para o tratamento de infecções por *S. aureus*.

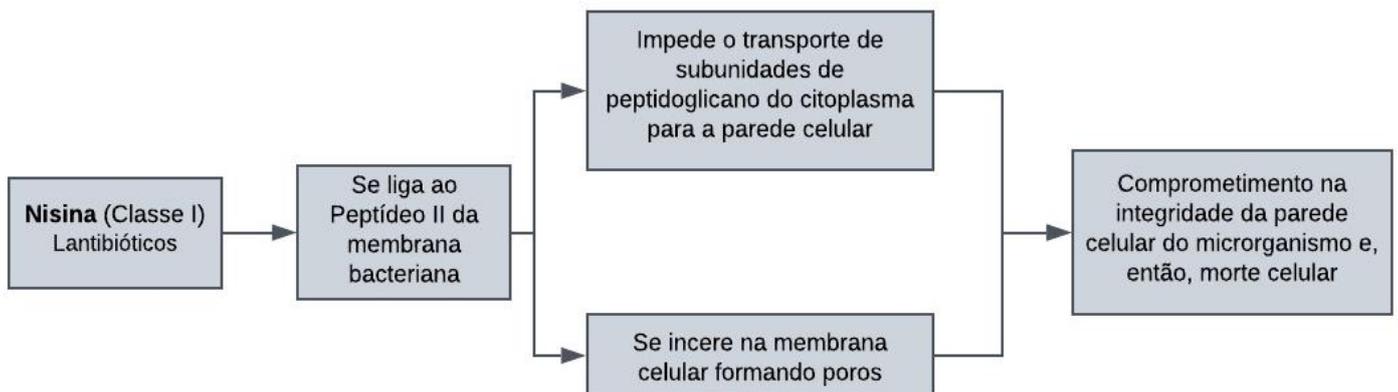
Fonte: Autor (2022).

Figura 3 - Mecanismo de ação antimicrobiano da nisina.



Fonte: SCHULZ (2003).

Figura 4: Modo de ação da nisina.



Fonte: Autor (2022).

Outro ponto a ser discutido é quanto a outros mecanismos menos clássicos de ação da nisina que não envolvem a formação de poros na membrana citoplasmática, mas são fundamentais para atacar outros compostos patogênicos, como a ativação de enzimas autolíticas em certos microrganismos alvos, ou a capacidade de inibir a germinação de esporos de bactérias Gram-positivas (MOLL; KONINGS; DRIESSEN, 1999; SOLTANI, 2021).

4. PRODUÇÃO DE NISINA

Há quatro etapas clássicas do crescimento de microrganismos em alimentos. A primeira fase é conhecida como fase “*lag*”, na qual o microrganismo recém inoculado está se adaptando ao meio, portanto, possui um crescimento lento. A segunda fase o microrganismo produtor já está adaptado e por possuir muitos nutrientes disponíveis cresce de forma acelerada, essa etapa é conhecida como a fase exponencial. A terceira etapa começa quando a população de microrganismos está alta e os nutrientes passam a ser consumidos e ficam menos biodisponíveis reduzindo a taxa reprodutiva, que se equivale à taxa de morte. Esta é a fase chamada de fase estacionária. Por fim, há a fase de declínio, na qual os microrganismos produzem toxinas e o número de mortes supera o número de novos microrganismos (TORTORA, 2000; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

Portanto, enquanto o microrganismo está em sua fase “*lag*” e exponencial (“*log*”) há a formação de nisina. No entanto, quando termina a fase exponencial ocorre uma redução significativa de produção do peptídeo (TORTORA, 2000; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015). Assim como o seu mecanismo de ação a síntese da nisina também ocorre em duas fases, na primeira etapa um peptídeo precursor é sintetizado pelo ribossomo, assim após o processo de pós-translocação pela atividade enzimática há a ativação do peptídeo bioativo (HOOVER; CHEN, 2003; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015). Esta ativação da nisina ocorre a partir da hidratação dos aminoácidos serina e treonina residuais, e então, há adição de cisteína na molécula química e uma dupla camada de dideidroaminoácidos. Isso resulta na formação de pontes de tioéter que ativam a molécula (DE VUYST; VANDAMME, 1993; ALVES, 2018).

De maneira específica para a síntese dos lantibióticos, classe à qual a nisina pertence, os pré-peptídeos são constituídos por uma sequência-líder na região N-terminal, essa deverá ser removida durante a maturação da proteína, a fim de torná-la ativa (HOOVER; CHEN, 2003;

VILVERT, 2019). Existem três etapas que formam a maturação, a primeira é a síntese do pré-peptídeo, em seguida ocorre a remoção da sequência N-terminal, essa segunda etapa é chamada de clivagem; e por fim a nisina já com sua função biológica ativa é excretada da célula (ENNAHAR *et al.*, 2000).

Após a liberação da bacteriocina, uma proteína histidina quinase detecta a presença de bacteriocinas e se autofosforila. O grupo fosfato é transferido a um regulador de resposta que ativa a transcrição de genes reguladores; assim, proteínas de imunidade e as dedicadas ao transportador ABC são produzidas (HOOVER; CHEN, 2003; ALVES, 2018).

A fim de induzir a síntese, o microrganismo precursor é submetido a condições de estresse, como a escassez de nutrientes (carbono; nitrogênio; fosfato); a proliferação populacional ou até mesmo pela presença de outros inibidores (RILEY, 2011; SAVADOGO, 2006; ALVES, 2018).

O lançamento da nisina para o meio de propagação depende, em especial, do pH desse ambiente. Para pH menores que 6,0 mais de 80% das nisinas produzidas são expulsas para o meio de propagação. No entanto, para pH alcalinos, ou seja, maiores de 6,0 grande parte das moléculas de nisina ficam associadas à membrana celular e no interior das células (PARENTE; RICCIARDI; ADDARIO, 1994; ALVES, 2018; CHIKINDAS *et al.*, 2018).

A produção comercial da nisina é feita através da fermentação em larga escala com meios que contenham ingredientes de qualidade alimentar (CHIKINDAS *et al.*, 2018). A maioria das aplicações em alimentos envolvendo bacteriocinas pode ser dividida em três categorias: bacteriocinas parcialmente purificadas (por exemplo, Nisaplin®, contendo 2,5% de nisina); laticínios e outros produtos fermentados de grau alimentício contendo bacteriocinas na forma de um fermentado bruto (por exemplo, MicroGARD ®); e produtos contendo bacteriocina e suas culturas produtoras (CHIKINDAS *et al.*, 2018; MAKHAL; KANAWJIA; GIRI, 2015).

4.1 DETALHES REFERENTES À PRODUÇÃO DA NISINA

Quanto à presença em alimentos, há três principais maneiras de adicionar as bacteriocinas. A primeira envolve a adição das BALs, suas precursoras no alimento, ou seja, garantir um ambiente propício para sua multiplicação e manutenção nos alimentos, conforme apresentado anteriormente. A segunda, envolve a adição das bacteriocinas purificadas ou semi-

purificadas, que são isoladas a partir da matriz do alimento por métodos conjuntos de adsorção; dessorção e cromatografia líquida (REVOLL-JUNELLES, 1996; CHIKINDAS *et al.*, 2018). Há também a opção da adição de um ingrediente fermentado por cepas bacteriocinogênicas (CHEN *et al.*, 2010; COTTER; HILL; ROSS, 2005; DEEGAN *et al.*, 2006; MAKHAL; KANAWJIA; GIRI, 2015).

Há as técnicas de grau alimentício para separar a nisina, tal qual o processo de semi-purificação utilizada para a produção da nisina comercialmente conhecida por Nisaplin®, nesse o produto é obtido a partir da fermentação de *L. Lactis* em um meio à base de leite, o leite é um produto perfeito para a multiplicação de nisina, pois é rico em açúcares (rico em lactose) e o baixo pH pela fermentação proporcionam a liberação da nisina para o meio (JOZALA, 2009). Assim, o fermentado resultante é subsequentemente concentrado e separado por meio do sistema micelar de duas fases aquosas (ALBERTSSON, 1956 ; VILVERT, 2019) processado por secagem em *spray dryer* ou liofilização e transformado em partículas pequenas. O produto consiste em 2,5% de nisina contida em NaCl e sólidos desnaturados do leite (DEEGAN *et al.*, 2006; JOZALA, 2009), sendo que a proporção de 1g deste produto é padronizada com uma atividade de 106 UI (Unidades Internacionais). Assim, 1g de nisina pura contém 40 x 106 IU. Uma atividade biológica de 40 IU corresponde a 1 μ g de nisina pura (DE VUYST; VANDAMME, 1994). Há outras matrizes alimentares que podem ser utilizadas como fontes de multiplicação de bacteriocinas como, por exemplo, a água residuária de indústria de fécula de mandioca (VILVERT, 2019).

Importante ressaltar que devido à natureza proteica, todas as bacteriocinas são inativadas por uma ou mais enzimas proteolíticas, incluindo as de origem pancreática e algumas de origem gástrica (DE VUYST; VANDAMME, 1994). Esta é uma característica interessante quando se refere à utilização em produtos alimentícios.

Quanto a purificação para as biomoléculas, quando são obtidas em grande quantidade o grau de pureza é algo secundário comparado aos custos de sua obtenção, assim técnicas cromatográficas, conhecida como purificação de alta resolução não são necessárias, pois bastam procedimentos que envolvem clarificação e purificação de baixa resolução. Porém, aplicações terapêuticas envolvem a necessidade da alta pureza desses peptídeos antimicrobianos (DE SOUZA OLIVEIRA, 2019).

Portanto, não é trivial purificar bacteriocinas, pois são moléculas que possuem baixa massa molecular e apresentam poucos peptídeos hidrofóbicos em sua composição, assim, usam-se métodos como precipitação; ultrafiltração; cromatografia de troca iônica; cromatografia de fase reversa; além do novo método que se relaciona ao sistema de duas fases aquosas que extrai

peptídeos antimicrobianos diretamente do meio fermentado, sendo mais barato que os métodos tradicionais (DE SOUZA OLIVEIRA, 2019).

A escolha da técnica está relacionada as propriedades inerentes de cada biomolécula, assim, a combinação correta de diversas etapas que explores essas características vai garantir a purificação eficaz. Um exemplo muito aplicável inicia com operações unitárias que ajudem na clarificação do sistema (filtração convencional; centrifugação; centrifugação tangencial; floculação) para reduzir a quantidade de sólidos em suspensão do sistema. Posterior a isso a molécula pode ser purificada em sistema de suas fases imiscíveis, e se a sua pureza deve ser alta então utiliza-se de métodos cromatográficos ou interação hidrofóbica de adsorção em membranas e afinidade (DE SOUZA OLIVEIRA, 2019).

Figura 5: Estratégia de purificação mais usadas para cada uma das bacteriocinas.

Bacteriocina	Fonte	Etapas*	Rendimento (%)	Fator de purificação	Referência
Plantaricina MG	<i>Lactobacillus plantarum</i> KLDS1.0391	1. CFS	100	1	Gong, Meng, Wang (2010)
		2. SA	95	14	
		3. CEM ^A	47	120	
		4. CFR	12	25.200	
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	1. CFS	100	1	Jozala et al. (2015)
		2. CIH ^B	285	774	
		3. CIH ^B	152	384	
Pediocina PA-1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> NCDC 273	1. CFS	100	1	Simha et al. (2012)
		2. SA	80	1,49	
		3. CTI ^C	128	340	

*Etapas de purificação: CFS (sobrenadante livre de células); SA (precipitação em sulfato de amônio); pH/AD (ajuste de pH para adsorção e desorção); EC (extração em clorofórmio); CTI (cromatografia de troca iônica); CEM (cromatografia de exclusão molecular); CIH (cromatografia de interação hidrofóbica); CFR (cromatografia de fase reversa). Colunas: A (superdex 75); B (butyl sepharose CL 4B); C (SP Sephadex); D (Waters Spherisorb); E (SP-Sepharose Fast Flow); F (Sephadex G10).

Fonte: DE SOUZA OLIVEIRA, 2019.

4.2 LIOFILIZAÇÃO COMO MÉTODO DE CONSERVAÇÃO DA NISINA

Como uma estrutura orgânica, a fim de manter suas características bactericidas e garantir a sua aplicabilidade em diferentes alimentos, é fundamental aplicar alguns métodos de

conservação. Um dos mais aplicados é a Liofilização, que consiste em remover a maior parte da água contida em um material previamente congelado por sublimação, assim, a água passa diretamente do estado sólido para vapor, sem passar pelo estado líquido (PASSAGLIA, 2019; LIMA, 2021). A fim de realizar esse processo três etapas devem ser realizadas. Na primeira, o material é congelado, a seguir a água é sublimada sob pressão reduzida e, na terceira etapa, a água é removida por dessorção, ou seja, uma secagem a vácuo (OLIVEIRA *et al.*, 2013) ; LIMA, 2021).

O termo *liófilo* significa amigo do solvente, portanto, são produtos altamente higroscópicos e de fácil dissolução em água. Isso auxilia na aplicabilidade da nisina em alimentos. Este é um processo mais caro quando comparado a métodos de conservação que se aplicam às fontes de calor, mas reduz de modo significativo a decomposição térmica, perda da funcionalidade, ações enzimáticas e a desnaturação de proteínas (LIMA, 2021). Assim, a liofilização é um método de conservação menos agressivo, que reduz alterações da morfologia inicial do material. Hoje em dia, é rotineiramente liofilizada uma grande variedade de substâncias, como: antibióticos, anticoagulantes, bactérias, vírus, enzimas, hormônios e frações do sangue (COSTA, 2021).

Os materiais liofilizados são apresentados na forma de pó e as atividades biológicas se mantêm estáveis por muito mais tempo, quando comparada com a conservação em solução aquosa. (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

4.3 APLICAÇÃO DA NISINA NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Cerca de 50 países aceitam o uso da nisina em diversos produtos, dentre eles enlatados (como sopas; vegetais e pescados); leite e derivados; sucos naturais entre outros (SCHULZ *et al.*, 2005; NASCIMENTO; MORENO, 2008; FREITAS, 2017). Na atualidade conceitos como saudabilidade e CLEAN LABEL são uma tendência mundial na indústria de alimentos, se concentrando em torno de alimentos mais seguros e saudáveis (DO PRADO VENÂNCIO, 2020).

Segundo a legislação brasileira, portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996, há aprovação da aplicação da nisina em todos os tipos de queijo, desde que o limite máximo de 12,5 mg/kg seja respeitado nas formulações. Além disso, o Brasil foi pioneiro na aplicação da nisina em produtos cárneos a fim de estender sua vida de prateleira. Um exemplo foi a aplicação da nisina tanto na superfície externa de salsichas de diferentes tipos quanto sobre superfícies de

embalagens (SCHULZ *et al.*, 2005; NASCIMENTO; MORENO, 2008).

De modo geral, a nisina possui um amplo espectro de aplicação e demonstra efeitos aditivos em combinação com outros agentes antimicrobianos. Isso torna possível a combinação sinérgica da nisina tanto com outros conservantes naturais, como óleos essenciais; quanto com conservantes químicos. Essa sinergia é capaz de reduzir ou substituir a aplicação de conservantes químicos, por vezes maléficis ao comensal quando consumidos de maneira recorrente, são exemplo os nitritos e os nitratos utilizados em embutidos (UBAQUE BELTRÁN, 2020; SILVA, 2020).

4.4 APLICAÇÃO DA NISINA NA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS

É aplicada principalmente para os derivados do leite, como em queijos, manteiga e requeijão, entre outros (DELVES-BROUGHTON, 2005; ARQUÉS OROBÓN, 2019), podendo ser usada isoladamente ou em combinação com outros métodos de conservação.

Sendo o queijo um dos principais derivados da indústria láctea, muito vendido e amplamente consumido, é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar (RIVAS, SILVA, TONDO, 2021). Há uma especial preocupação com os queijos frescos artesanais por serem elaborados a partir de leite cru e não sofrerem processo de maturação (ROZENTAL *et al.*, 2018). Assim, a contaminação microbiana desses produtos possui relevância para a indústria devido às grandes perdas econômicas que os descartes desses produtos podem significar, como também para a saúde pública, pelo risco de causar doenças aos consumidores.

A fim de evitar o uso de conservantes químicos, muitas pesquisas vêm sendo realizadas para analisar a eficiência da aplicação da nisina em diversos tipos de queijos, como o queijo branco; queijo minas; queijo coalho e nos mais diferentes modos de aplicação como na superfície por meio de revestimentos alimentícios com concentrações de nisina ou diretamente na matéria prima.

No Brasil, boa parte dos produtores ainda são produtores rurais que vendem seus produtos em feiras locais, sendo comum produzirem queijos artesanais pois tem sua origem a partir de leite cru e, que por muitas vezes não possuem o conhecimento de como garantir todos os devidos cuidados de higiene e processos que sigam as Boas práticas de Fabricação (TAVARES *et al.*, 2019). Como resultado temos um produto que não apresenta segurança microbiológica e padronização da qualidade (FEITOSA *et al.*, 2003; TAVARES *et al.*, 2019).

Há diversos estudos que demonstram a baixa qualidade microbiológica desse subproduto da indústria. Muitos relataram não apenas a ocorrência de microrganismos patogênicos, mas também uma baixa vida de prateleira causada pela alta concentração de microrganismos deterioradores em números que excedem, às vezes, os limites estabelecidos pela legislação (TAVARES *et al.*, 2019; BATISTELLA; PEDROSA, 2021; SALOTTI *et al.*, 2006).

Entre as bactérias patogênicas observadas destacam-se *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (ANDRADE *et al.*, 2007; ARQUÉS OROBÓN, 2019). Como já mencionado, a nisina é um tipo de bacteriocina que possui capacidade de inibir grande parte das bactérias Gram positivas (QUICHABA, 2021) e uma maneira revolucionária de aplicação é como revestimento comestível em queijos artesanais (SOUZA, 2020) ou como filme comestível. A diferença entre esses dois métodos está no fato que a cobertura comestível é uma fina camada de material aplicado e formado diretamente na superfície do produto, já no caso do filme, é pré-formado separadamente e aplicado sobre o produto depois (SOUZA, 2020).

Assim, como alternativa há a aplicação da nisina diretamente na matéria prima, para garantir a qualidade desde o processo inicial da cadeia produtiva, em especial para produtos que possuem obrigatoriedade da utilização de leite cru e a necessidade da realização de investigações para o estabelecimento de procedimentos que reduzam consideravelmente a chance de contaminação do queijo (SOUZA; CONTESSA; GONÇALO, 2017).

Tabela 2 - Estudos da aplicação da nisina em diferentes tipos de queijo.

Produto	Aplicação e Resultados
<i>Queijo Coalho</i>	<p>SOUZA, Lara Barboza (2020) avaliou a ação da nisina na forma de um revestimento comestível contra os microrganismos (aeróbios mesófilos, coliformes a 35° e 45°, fungos filamentosos e leveduras, <i>Staphylococcus</i> sp. e <i>Salmonella</i> sp.) no artigo “Aplicação de Nisina como revestimento comestível em queijo coalho”.</p> <p>Nesse artigo dois experimentos foram realizados, sendo que o que interessa a essa discussão está descrito no experimento II. Neste foram avaliadas amostras de queijo coalho durante 20 dias de armazenamento refrigerado à 5°C, em intervalos de cinco dias, com dois revestimentos ativos elaborados</p>

com soro, gelatina (10%) e amido (10%), e adição de nisina no revestimento.

Após revestimento e formação da cobertura, as amostras foram submetidas às análises microbiológicas (contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e pesquisa de *Salmonella* sp.) além de testes físico-químicos como a determinação instrumental do pH, cor e perfil de textura (firmeza, elasticidade, coesividade, gomosidade e mastigabilidade).

A contagem microbiana do queijo controle foi mais elevada em todo o período de análise. O revestimento demonstrou potencial para aplicação como barreira à contaminantes em queijos, além de manter as características de frescor. Alterações na consistência da massa foram significantes após 15 dias de armazenamento refrigerado. A cobertura comestível bioativa demonstrou potencial de aplicação à conservação de queijo coalho e possibilitou maior estabilidade do alimento.

A autora reforçou que tal resultado estava atrelado á Boas Práticas de Fabricação durante todo o processamento, aplicada por ela, e que o leite foi retirado de um produtor local e não passou por tratamentos térmicos.

Queijo Minas

SOUZA, Nathiéli Bastos (2017) desenvolveu no artigo “Ação antimicrobiana de bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei*: uma análise de resistência e aplicação em queijo minas frescal” uma análise da aplicabilidade sobre o queijo Minas frescal (devido a sua perecibilidade) da bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei*, que foi isolada de salame italiano. Focando, em especial para a estabilidade relacionada ao pH e temperatura.

Para isso, a autora fez testes que validaram a estabilidade da bacteriocina frente a variações de pH e temperatura, através de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2². Foi feita uma análise in vitro com os microorganismos *S. aureus* e *E. coli*, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* para posterior aplicação no alimento.

Três formulações de queijos foram realizadas. Na primeira houve a incorporação da bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei*, outro contendo a bacteriocina nisina e um queijo controle, sem adição de conservantes. O queijo produzido seguiu as boas práticas de fabricação e para sua formulação optou-se por utilizar leite cru, adquirido de produtores locais.

Como resultado, através do DCCR foi possível observar que os tratamentos não apresentaram diferença significativa com média de aproximadamente 100 % de inibição frente ao patógeno *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* para ambos os tratamentos. Ilustrando a maior estabilidade da bacteriocina a pH mais próximos à neutralidade.

Nas análises *in vitro* observou-se que o tempo de fermentação da BAL interfere na concentração da bacteriocina, porém foi eficiente na inibição dos micro-organismos testados. Quanto às análises de estabilidade microbiológica dos queijos, a bacteriocina utilizada no estudo apresentou ação inibitória diminuindo a contagem de estafilococos coagulase positiva no primeiro dia de armazenamento em aproximadamente 78,85% da contaminação inicial. Mostrando-se eficiente como conservante e sem diferenças significativas em relação à utilização de nisina (bacteriocina comercial).

Assim, conclui-se que a bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei* isolado de salame italiano apresenta efeito positivo na inibição de patógenos como *S. aureus* e *E. coli*, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*.

Portanto, a nisina e a bacteriocina isolada apresentam capacidade de controle de microrganismos e ampla utilização em matrizes alimentares que passam por tratamentos térmicos uma vez que apresentaram estabilidade a elevadas temperaturas.

Fonte: Autor (2022).

4.5 APLICAÇÃO DA NISINA NA INDÚSTRIA CÁRNEA

Segundo o *Codex Alimentarius* carne é "todas as partes de um animal que foram considerados seguras e adequados para consumo humano ou se destinam a esse fim". Portanto, a primeira premissa é que todo animal que foi abatido para que se ofereça para o comensal deve ter segurança alimentar para ser definida como carne. Logo, é fundamental garantir não só os aspectos nutricionais, sensoriais e de conveniência preparação do produto, mas fundamentalmente também a segurança alimentar e o prazo de validade (DOMINGUEZ OROZCO, 2020).

A carne é composta de proteínas e aminoácidos; água; minerais e vitaminas; gorduras e ácidos graxos e outros componentes bioativos, além de pequenas quantidades de carboidratos

(FAO, 2015, p.4). Portanto, há desafios em manter a saudabilidade desse produto devido a sua complexa formação bioquímica, e por conta dessa complexidade tornam-se produtos muito suscetíveis à microrganismos patogênicos, dentre eles o principal é a *L. monocytogenes*, bacilo Gram-positivo, não formador de esporos, anaeróbio facultativo (THAKUR, ASRANI, PATIAL, 2018). Essa é o agente etiológico da listeriose, doença que causa infecções do sistema nervoso central; endocardite; além de sérios problemas para mulheres grávidas como aborto e mal formação do feto. Listeriose é uma doença preocupante para indivíduos imunocomprometidos como portadores de HIV, idosos, mulheres grávidas e neonatos (BUCHANAN, 2017). É fundamental destacar que o principal vetor de *L. monocytogenes* são os alimentos, com destaque para a sua capacidade de multiplicação mesmo sob temperaturas de refrigeração e a tolerância às altas concentrações de sal sendo capaz de se multiplicar sobre condições altas de nitritos e nitratos (DA SILVA; FREITAS, 2021).

Importante ressaltar que além dessas habilidades, a *L. monocytogenes* possui também elevada resistência fisiológica. Esta resistência, aliada à capacidade de formar biofilmes nos equipamentos de plantas processadoras de alimentos, torna este microrganismo uma ameaça à indústria (DA SILVA, FABRÍCIO REIS GOMES; RIBEIRO, LARYSSA FREITAS, 2021).

A fim de se controlar a presença desse patógeno em alimentos é necessária uma combinação de vários fatores, o primeiro dele é a saudabilidade do animal abatido e as garantia de boas práticas de fabricação e 5S nesses ambientes. Além disso, parâmetros como temperatura de processamento; atividade de água do alimento; presença de sais; pH; compostos químicos e suas concentrações, entre outros devem ser monitoradas e garantidas. A junção adequada destes fatores permite criar um ambiente adverso para o patógeno resultando na redução da sua taxa de multiplicação (BOZIARIS *et al.*, 2007; DOMINGUEZ OROZCO, 2020).

Porém, a alta concentração de compostos químicos para a conservação de alimentos não é compatível com a imagem de produtos “frescos” e há riscos em utilizar-se de grandes concentrações de conservantes químicos como nitritos e nitratos adicionados em alimentos cárneos com o objetivo de aumentar a segurança e da vida útil desses alimentos, pois seu consumo frequente em grandes concentrações pode gerar em seus consumidores nitrosaminas carcinogênicas (CHEN *et al.*, 2010 ; SILVEIRA, 2019).

Assim, entra a aplicação de BAL produtoras de bacteriocinas como tecnologia alternativa para o aumento da segurança e da qualidade alimentar. Ou apenas a aplicação da nisina já produzida e isolada tanto como um dos ingredientes de sua composição como na forma de revestimento alimentício (SILVA, 2020; DOMINGUEZ OROZCO, 2020).

Abaixo há exemplos que, a partir da incorporação de nisina e em conjunto com outros

compostos bioativos, houve boas respostas quanto a vida útil das matrizes alimentares.

Tabela 3 - Estudos da aplicação da nisina em carnes.

Produto	Aplicação e Resultados
Carne Bovina Crua	<p>CÁCEDA CABRERA, José Alberto (2018) avaliou a ação da nisina contra o microrganismo <i>Listeria</i> ssp. no artigo “Efeito da concentração de nisina no crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> em carne bovina crua”. Portanto, avaliou-se a relação entre a concentração de nisina com o crescimento de <i>Listeria</i> ssp.</p> <p>Para tanto, cerca de 50 g de carne crua foram retirados e tratados com 500 UI/g, 1000 UI/g e 1500 UI/g de nisina. O autor preparou as soluções de nisina conforme previsto pelos autores Benkerroum e Sandine (1998), onde a nisina comercial foi dissolvida em água destilada acidificada com pH de 2,0 a partir de ácido clorídrico e esterilizada com uso de membrana, e armazenada a baixas temperaturas (2 °C á 8 °C).</p> <p>As amostras de carne foram depois inoculados com 103 ufc/g de <i>L. monocytogenes</i> e incubados a 4 °C por 5 dias e a 37 °C por 36 horas. E adicionadas da solução de nisina.</p> <p>Posteriormente, foram retiradas alíquotas de 10 g e a contagem foi realizada em ágar Oxford Suplementado após 48 horas de incubação a 35 °C. O crescimento de <i>L. monocytogenes</i> nos grupos tratados com 1.000 UI/ge 1.500 UI/g foi significativamente ($P < 0,05$) inibido em relação ao grupo controle.</p> <p>O autor pode constatar, portanto que quanto maior a presença de nisina, maior a capacidade contra o microrganismo patogênico. Assim como, o grau de inibição aumentou com a diminuição da temperatura de incubação.</p>
COPA	<p>LUCIANO, Carla Giovana (2020) desenvolveu filmes ativos a base de gelatina, com duas camadas, uma camada de gelatina sem aditivo, e uma segunda camada, mais fina, contendo os princípios bioativos: agente antioxidante (extrato hidroetanólico de folhas de pitangueira EHFP) e/ou agente antimicrobiano (nisina).</p>

Especificamente, pretendeu-se estudar as atividades antioxidante e antimicrobiana dos filmes ativos dupla camada na conservação da Copa fatiada. Como resultado a nisina foi capaz de produzir filmes com atividade antimicrobiana, enquanto a adição do EHFP produziu filmes com atividade antioxidante. A adição de ambos os aditivos gerou filmes que manifestaram atividades antioxidantes e antimicrobiana.

A adição conjunta do extrato com o agente antimicrobiano permitiu observar que não houve interação entre eles que pudesse diminuir ou inibir a ação de um dos compostos. Ou seja, esses filmes a base de gelatina incorporados com agentes ativos podem ser usados como um potencial material de embalagem ativa para aumentar a vida útil e a segurança dos alimentos. No estudo da aplicação dos filmes comprovou-se a eficiência da incorporação de ambos os aditivos na segunda camada do filme em contato com o alimento, na conservação do produto em estocagem a 4 °C por até 120 dias, comparado com o controle. Pode-se então concluir que foi possível desenvolver filmes ativos, com atividades antioxidante e antimicrobiana, com potencial aplicação na conservação de alimentos.

Salsichas

SILVA, Selma Eufrasio Durante (2020) em seu trabalho “Biofilme com incorporação de nisina: aplicação em salsicha” realizou uma análise da aplicabilidade da nisina sobre o aumento da vida de prateleira e potencial redução de perdas das salsichas prontas para o consumidor.

A autora realizou isso ao 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 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. Assim, 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 ($p > 0,05$).

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.

Fonte: Autor (2022).

4.6 APLICAÇÃO DA NISINA NA INDÚSTRIA DE MINIMAMENTE PROCESSADOS

Ao comprar frutas e verduras diversos fatores são levados em conta, como a qualidade; a integridade e a aparência do produto; a praticidade ao cozinhá-la; nutrição do alimento, entre outros fatores. No entanto, ambas são estruturas perecíveis, em especial quando submetidas à etapa de minimamente processados.

Os produtos minimamente processados passaram por operações como seleção, lavagem, classificação, fatiamento, sanitização, centrifugação, embalagem e refrigeração, obtendo-se produtos comestíveis frescos e que não necessitam de preparo subsequente. Ou seja, os métodos de processamento mínimo são técnicas que preservam os alimentos, a fim de manter a qualidade nutritiva e as características sensoriais do produto (DE ARAUJO, 2020).

Conforme em outras matrizes alimentares, os responsáveis pela redução da vida de prateleira desses produtos são as reações bioquímicas nos tecidos cortados, além do crescimento microbiano e do aumento a exposição a esses deteriorantes, que podem, assim, provocar o aumento do risco de surgimento de doenças transmitidas por alimentos. Além disso, há o aumento do contato para gerar a ação de enzimas (BARROS, 2020).

Como solução para essas perdas se apresenta o uso de revestimentos comestíveis que evitam o escurecimento; podem ter propriedades de evitar o contato com patógenos e por conta

da proteção dessas estruturas aumentam a vida útil do produto, pois protege a superfície do alimento cortado, mantendo assim, a aparência fresca do produto por mais tempo. Esses revestimentos possuem uma lógica simples, onde os aditivos bioativos, previamente calculados a concentração, são adicionados á matriz biopolimérica que compõem a solução formadora do filme (LUCIANO, 2020).

Outro ponto importante que deve ser salientado é o fato de a presença desses revestimentos reduzirem as trocas gasosas do produto com o meio, evitando a degradação do alimento devido a redução do processo de maturação do fruto; legumes e vegetais. Com o avanço das pesquisas, nos últimos anos, tem desenvolvido e popularizado a aplicação de revestimentos comestíveis, tornando esse um dos métodos mais utilizados na conservação de produtos minimamente processados como, por exemplo, em abóbora (PAIVA, 2019), e em pêssegos (RIBEIRO, 2020).

A fim de produzir a camada protetora usa-se, em especial, estruturas base de amido. Normalmente utilizam-se polissacarídeos como derivados da celulose; fécula de mandioca, alginato, caragena, pectina, quitosana (COSTA *et al.*, 2019)

Á esses revestimentos comestíveis são adicionados compostos ativos com diferentes funções, ou seja, compostos de interesse como agentes antioxidantes, e agentes antimicrobianos naturais (KOHATSU *et al.*, 2017; MAYER, 2018). Um desses compostos de interesse é a Nisina, proteínas ou complexos proteicos que pela ação antimicrobiana, e por não interferem nas características físico-químicas e organolépticas do alimento, são adicionadas as proteções (CARNELOSSI, 2021; DE OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2015).

Tabela 4 - Estudos da aplicação da nisina em diferentes tipos de produtos minimamente processados.

Produto	Aplicação e Resultados
----------------	-------------------------------

Revestimento de Salada de Frutas com proteção de Nisina

COUTO, Hyrla Grazielle Silva de Araújo (2016) teve como objetivo em seu estudo avaliar a ação do revestimento comestível à base de amido de milho adicionado da bacteriocina nisina, na conservação de salada de frutas minimamente processadas.

As saladas foram compostas por mamão, manga e abacaxi. Após processamento mínimo passaram pelos seguintes tratamentos: salada de frutas sem revestimento (controle); revestimento de amido de milho sem Nisina; e revestimento de amido de milho com nisina.

Todos os produtos foram acondicionados em embalagens por 12 dias a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$. Constantemente foram realizadas análises físico-químicas de teor de sólidos solúveis, pH, acidez titulável, teor de ácido ascórbico, compostos fenólicos, carotenóides, cor, perda de massa fresca e atividade da enzima polifenol oxidase. As análises microbiológicas incluíram contagem de aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, e a análise da sobrevivência de *Listeria monocytogenes*, previamente inoculadas.

Como resultado as saladas de frutas tratadas com revestimento comestível e nisina apresentaram perda de massa significativamente menor, e maior teor de vitamina C. Além disso, frutos revestidos possuíam teores significativamente menores de sólidos solúveis e menor atividade da enzima polifenol oxidase. Foi verificado aumento na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos em todas as amostras, porém, em amostras revestidas com amido e nisina, verificou-se que população microbiana foi estatisticamente menor que nos demais tratamentos.

Outra constatação interessante foi que a presença da nisina resultou em redução significativa no número de células viáveis da bactéria *L. monocytogenes* ssp. presente no meio, comportamento não verificado nas amostras dos demais tratamentos durante os 12 dias de estocagem.

Assim, os resultados obtidos neste estudo demonstram que a utilização de revestimento de amido de milho e nisina, associado a boas práticas de processamento mínimo e controle das condições de armazenamento (temperatura e umidade), foi eficiente na conservação de saladas de frutas minimamente processadas. Uma vez que interferiu positivamente nos parâmetros físico-químicos avaliados, e obteve os melhores resultados em relação a manutenção

da qualidade microbiológica das saladas por até 12 dias.

**Aplicação de
revestimentos de nisina,
quitosana e natamicina
em kiwi e morango
minimamente processados**

A autora COSTA, Maria Clara Caldas (2019) em sua revisão da aplicação de biofilmes relatou a aplicação da nisina em conjunto com outros produtos (CÉ, 2009) como quitosana e natamicina, com a finalidade de avaliar o efeito dessa junção de elementos na formação de proteção sob refrigeração para conservação de kiwi e morango minimamente processados.

Foi avaliado o emprego de diferentes concentrações de quitosana, nisina e natamicina durante o armazenamento das frutas. Nessa análise determinou-se diferentes parâmetros que garantem uma fruta bem conservada como a variação da atividade de água; redução da vitamina C, variação de pH e a perda de peso pela perda de água para o meio; concentração de sólidos solúveis; além, claro, da avaliação microbiológica das frutas, sob refrigeração e durante os intervalos de 1, 7 e 14 dias.

Como resultado, o autor verificou que os filmes com a combinação dos antimicrobianos foram eficientes para evitar a deterioração microbiológica, no entanto, não foram responsáveis por gerar mudanças positivas nas análises físico-químicas. Enquanto o kiwi demonstrou melhoras constantes quanto à pH; índices de sólidos solúveis e altos valores de vitamina C, nos morangos, apenas a umidade e a vitamina C foram variáveis que apresentaram não apresentaram perdas significativas com adição das coberturas.

Portanto, pela ação dos filmes adicionados de materiais bioativos houve a preservação de alimentos, garantindo a estabilidade das frutas frente à deterioração microbiana, aumenta a garantia de obtenção de kiwis e morangos sadios minimamente processados por mais tempo ao consumidor.



Fonte: Autor (2022).

4.7 APLICAÇÃO DA NISINA NA INDÚSTRIA DE PESCADOS

Pescado é um termo genérico o qual engloba uma variedade de animais marinhos que incluem peixes, moluscos, crustáceos, anfíbios, quelônios e mamíferos de água doce ou salgada, que são disponibilizados para a alimentação humana (BRASIL, 2017).

O pescado é uma rica fonte de proteína para a alimentação humana. No entanto, seu consumo é limitado devido a rápida deterioração que esses alimentos sofrem assim que são retirados do mar (IAHNKE, 2022). Esses são um dos alimentos mais vulneráveis e possuem baixa vida útil, devido a suas propriedades biológicas. Assim, por conta da busca por produtos de qualidade, e, especialmente os saudáveis, houve um estímulo ao desenvolvimento de novas pesquisas para a criação de tecnologia de obstáculos como forma de conservação (ANDRADE *et al.*, 2007). O princípio fundamental que rege esta conservação é o controle do desenvolvimento microbiano, por meio do uso de uma série de obstáculos que funcionam como barreiras à sobrevivência dos micro-organismos ou que inviabilizam a ação dos microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos como redução da temperatura de armazenamento; processos térmicos e aplicação de barreiras como os biofilmes (GIAMPIETRO; REZENDE-LAGO, 2009; REZENDE-LAGO, 2021).

Portanto, conforme citado acima, os pescados são alimentos vulneráveis à deterioração, em especial, são predispostos a sofrerem oxidação lipídica que causa odores e sabores indesejáveis ao produto (DE OLIVEIRA ROSA, 2019). E essa deterioração ocorre de forma rápida e expressiva, ocorrendo graças a ação de agentes microbiológicos psicotrópicos, tais como *Pseudomonas*, *Shewanella* e *Flavobacterium* spp. (CORDEIRO *et al.*, 2021)

A capacidade de venda e compra desse produto está associado ao grau de frescor e a

garantia da qualidade até a chegada ao consumidor. O pescado de ótima qualidade mantém características sensoriais e microbiológicas típicas de peixe fresco, e, para tanto é fundamental que durante a despesca ocorram procedimentos apropriados de abate e acondicionamento em baixas temperaturas (BERNANDES, 2021).

Quanto à oxidação, esta está associada à composição lipídica desses produtos, que possuem elevados teores de ácidos graxos insaturados, favorecendo reações que iniciam com a formação de radicais livres, caracterizando-se por uma absorção acelerada de oxigênio, e finalizam com a produção de peróxidos, ou seja, são substâncias instáveis e se decompõem em aldeídos e cetonas que geram mudanças sensoriais negativas (MACHADO *et al.*, 2020; FREIRIA, 2017). Além disso, grande concentração de água nesses alimentos frescos gera um aumento significativo da velocidade de oxidação, uma vez que há biodisponibilidade para a atividade dos metais catalisadores dessa reação (IAHNKE, 2022).

A fim de aumentar a vida de prateleira desses produtos, tecnologias de barreiras são empregadas. Assim, essas tecnologias se fundamentam na aplicação de parâmetros combinados (obstáculos) que podem atuar de diferentes formas, como por meio da sinergia a fim de inibir ou atrasar o crescimento microbiano resultando em produtos estáveis a temperatura ambiente (ANDRADE *et al.*, 2007; IAHNKE, 2022).

Logo, a conservação sugerida pelo método de barreiras é baseada na seleção de diferentes obstáculos para se evitar a deterioração dos alimentos, inibindo o crescimento de micro-organismos (LEISTNER & GOLD, 2002; BARROS *et al.*, 2020). Segundo com Leistner (2002) quanto maior o número de barreiras presentes, então mais acelerada é a exaustão metabólica devido à energia necessária para manter a homeostase interna sob condições de estresse.

Entre essas técnicas de barreira temos barreiras físicas, como a ação de meios térmicos para inativar os microrganismos, como pasteurização; esterilização; refrigeração entre outros. Temos meios físico-químicos como atividade de água, sal; nitritos e nitratos. E temos barreiras microbiológicas como a bacteriocina nisina (CORDEIRO *et al.*, 2021).

Assim, a nisina é de grande importância para a conservação de pescados, já que essa barreira gera modificações que melhoram as condições sensoriais desses produtos, aumentando a estabilidade dos alimentos e fazendo com que sua vida de prateleira seja estendida mesmo sobre produtos frescos. Além disso, há um incremento da segurança alimentar e a possibilidade de servir mais consumidores, de forma segura, mesmo estando distantes das fontes de produção desse alimento (CORDEIRO *et al.*, 2021).

Tabela 5 – Estudo da aplicação da nisina em pescados.

Produto	Aplicação e Resultados
Salsicha de Lulas e Camarões	<p>O autor AGUILERA, Diego J. (2020) desenvolveu o estudo “Prazo de validade de frutos do mar recheados armazenados a frio com a adição de um antimicrobiano natural (nisina)” com o intuito de avaliar o prazo de validade de um produto marinho feito de lula e camarão tipo salsicha, armazenado em refrigeração e embalado a vácuo, com adição de um antimicrobiano natural.</p> <p>As análises realizadas foram acompanhamentos físico-químicos e microbiológicos do produto de linguiça de lula e camarão durante o armazenamento refrigerado. Portanto, foi realizada a capacidade de retenção de água desse produto (CRA - 79,66%); atividade de água (Aw) (0,976), potencial de hidrogênio (pH) (6,68) e perfil de textura e exames microbiológicos (mesofílicos, psicrófilos como coliformes totais, coliformes fecais, <i>E. coli</i>, <i>S. aureus</i> e <i>Vibrio</i> spp).</p> <p>Como resultado, a aplicação da nisina garantiu a meta de 15 dias para a validade do produto que fora proposta no início da pesquisa. Dentro dos parâmetros microbiológicos, os psicrófilos aeróbios foram o ponto de corte de a vida útil do produto tipo salsicha. Sendo assim, constatou-se que essa aplicação atende às tendências atuais de consumo ao incluir um conservante natural.</p>

Fonte: Autor (2022).

4.8 APLICAÇÃO TERAPÊUTICA DA NISINA

Tradicionalmente a nisina é utilizada em alimentos, no entanto pesquisas recentes evidenciam o uso dela com finalidades terapêuticas. Uma das principais aplicações está relacionada ao uso da nisina no tratamento de diferentes enfermidades para animais, como cães e bovinos. Um dos exemplos dessa aplicação está relacionado à aplicação de nisina em produtos odontológicos como agente antibacteriano para a prevenção cáries dentais para animais (TROVÃO, 2017).

Outras pesquisas mostram a eficácia da atividade antimicrobiana da nisina no controle

de infecções causadas por *Staphylococcus* ssp. em um modelo animal, tanto no trato respiratório quanto que gera mastite, uma inflamação do parênquima mamário que pode ser causada por diversos agentes infecciosos e é considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no Brasil (DE KWAADSTENIET; DOESCHATE; DICKS, 2009; DOESCHATE; DICKS; MELLETT; HOFFMAN, 2004; FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; KOPROVSKI, 2021; SILVA, 2018).

Além disso, há estudo da aplicação de nisina como uma alternativa eficiente a antibióticos para o tratamento de mastite estafilocócica durante lactação em humanos também (VIDUEDO, 2015). Além disso, bacteriocinas produzidas por espécies de *Enterococcus*, *Lactococcus* sp. e *Streptococcus* sp. são relacionadas como forma de tratamento alternativo contra a acne de origem bacteriana (CEBRIÁN, 2017).

Além dessas aplicações há uma vertente que estuda a nisina como futuro para tratar de microrganismos que se tornaram resistentes à tratamentos tradicionais com antibióticos. A crescente de patógenos resistentes é considerada uma das principais causas de infecções hospitalares, contribuindo para uma elevada taxa de mortalidade (SAHA *et al.*, 2017; BAUER & SAMPATHKUMAR, 2017).

Entre os patógenos resistentes temos o *Staphylococcus aureus*, que se tornou resistente ao antibiótico metilina (MRSA). O autor SILVA, César Matos Ribeiro (2018) relatou sobre a ação da nisina sobre o microrganismo *Staphylococcus aureu*. Segundo o autor esse patógeno é um dos maiores problemas de saúde pública devido a sua habilidade adquirida de desenvolver resistência à antibióticos tradicionais como a metilina.

Nesse sentido, entra em ação a habilidade das Bacteriocinas que são apontadas como alternativas promissoras para o controle deste patógeno. As vantagens da bacteriocinas iniciam ao serem ativas contra diversos patógenos humanos e por atuarem sem afetar a microbiota normal do corpo. Ao serem comparadas aos antibióticos possuem a vantagem de serem inativadas por enzimas digestivas do corpo humano (ALCÍVAR; ESPINOZA ZAMBRANO, 2018). A mais fundamental diferença entre as bacteriocinas e antibióticos é que as bacteriocinas restringem a sua atividade a certos patógenos, enquanto os antibióticos têm um espectro de atividade amplo. Além disso, as bacteriocinas são sintetizadas ribossomicamente e produzidas durante a fase Log de crescimento do microrganismo, enquanto os antibióticos são geralmente metabolitos secundários (DE SOUZA OLIVEIRA, 2019).

5. CONCLUSÃO

Portanto, como constatou-se os alimentos se deterioram com facilidade, perdendo tanto as características organolépticas, quanto reduzindo sua qualidade nutricional. Isso gera, como consequência, uma diminuição na vida de prateleira dos produtos e podem colocar em risco a saúde do comensal. A fim de conservar os alimentos com qualidade e segurança alimentar, fica claro a necessidade de se desenvolver alternativas para que, atreladas às tecnologias existentes (desidratação; tratamentos térmicos; congelamento; refrigeração; radiação etc.), possibilitem à indústria disponibilizar alimentos de qualidade microbiológica sem adição em demasia de aditivos alimentares não naturais. Neste sentido, como aliados, surgem as

bacteriocinas, que são substâncias naturais com propriedades bioconservadoras, advindas de bactérias Ácido Láticas (BAL). Essas nisinas, conforme citado, são peptídeos antimicrobianos extracelulares, sintetizados nos ribossomos dos microrganismos *Lactococcus* ssp. Esses peptídeos apresentam ambas as ações bacteriostática ou bactericida, especificamente em bactérias Gram-positivas, incluindo a esporulação, mas dependendo da matriz também é aplicada em bactérias Gram-negativas. Portanto, pode-se verificar que o espectro de ação da nisina é amplo, e dentre os microrganismos patogênicos, os particularmente sensíveis à ação da nisina são: *Actinomyces* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp., *Listeria* spp., *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. Este peptídeo é o único aditivo da classe que é liberado pelo FDA para aplicação em alimentos utilizados em consumo humano. Foram realizados estudos toxicológicos *in vitro* (toxicidade aguda, crônica e subcrônica, resistência cruzada e sensibilidade alérgica) que demonstraram que a ingestão da nisina não causa efeitos tóxicos ao organismo humano uma vez que é inativada pela quimi tripsina, enzima que é produzida pelo pâncreas e é liberada no intestino delgado. A fim de descrever a ampla atividade da nisina diversos artigos que exemplificam a atividade positiva da aplicação da nisina foram evidenciados neste trabalho de conclusão de curso. Comprovando, assim, que ao usar a nisina como um agente antimicrobiano, independentemente do tipo de matriz alimentar em que é aplicada, os resultados coincidem em alcançar um aumento da vida útil dos produtos reduzindo a necessidade de adicionar outros conservantes não naturais, que são cada vez menos apreciados pela população e cada dia mais evitados, e não alterando as propriedades organolépticas e propriedades e físico-química nas matrizes em que foram adicionadas.

6. REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, P. A. Chromatography and Partition of Cells and Cell Fragments. **Nature**, v. 177, n. 4513, p. 771–774, 1956.
- ALVES, F. C. B. Mecanismos de ação da atividade antibacteriana da nisina e em combinações com antimicrobianos tradicionais sobre *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA). **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, 2018.
- ANDRADE, N. J. DE et al. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 205–214, 2007.
- ARIAS, J. L. DE O. Determinação de conservantes em alimentos processados empregando QuEChERS, SILLME E HPLC-UV: estudo de métodos e estimativa da ingestão diária. p. 147, 2019.
- ARECHA VALETA, Nathasha Noronha. Avaliação de espécies de *Lactobacillus* quanto ao seu efeito bioprotetor e tolerância aos conservantes de alimentos. 2020.

ARQUÉS OROBÓN, Juan Luis. Tratamientos combinados de bacteriocinas y otros sistemas inhibitorios para la mejora de la seguridad de los productos lácteos. *Ene*, v. 11, p. 18, 2019.

AYMERICH, T. et al. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. ***Applied and Environmental Microbiology***, v. 62, n. 5, p. 1676–1682, 1996.

BAHRAMI, A. et al. Nanoencapsulated nisin: An engineered natural antimicrobial system for the food industry. ***Trends in Food Science and Technology***, v. 94, p. 20–31, 2019.

BARBOSA, A. A. T. et al. Nisin resistance in Gram-positive bacteria and approaches to circumvent resistance for successful therapeutic use. ***Critical Reviews in Microbiology***, v. 47, n. 3, p. 376–385, 2021.

BARROS, D. DE M. et al. Potencial Utilização de Sistemas Antimicrobianos Naturais como Conservantes Alimentares. ***Brazilian Journal of Development***, v. 6, n. 6, p. 40476–40491, 2020.

BATISTA-GONZÁLEZ, A. et al. Evaluación teórica de la exposición dietaria a la bacteriocina nisina como conservante natural para aderezos de tipo mayonesa vegetal en Chile. ***Revista chilena de nutrición***, v. 49, n. 4, p. 494–501, 2022.

BATISTELLA, V. M. C.; PEDROSA, A. Qualidade microbiológica de queijos Minas Frescal artesanais. ***Scientific Electronic Archives***, v. 14, n. 5, p. 99–103, 2021.

BERNANDES, L. C. ET ALL. a Relevância Dos Processos De Acondicionamento E. p. 1–20, 2021.

BOZIARIS, I. S. et al. Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations. ***Journal of Applied Microbiology***, v. 102, n. 3, p. 796–805, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 02/01/2001, p.1-54, 2001.

BRASIL. Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei Nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei Nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial União, Brasília, 30 mar 2017.

CÁCEDA, J. Efecto de la concentración de nisina sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 en carne de res cruda. p. 66, 2018.

CARRIM, A. J. I. Bioprospeção de microrganismos endofíticos com atividade enzimática e bacteriocinogênica em isolados de *Jacarandá decurrens* Cham. (Carobinha do campo). Goiânia, 2005. 78 f. Dissertação (Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública). Universidade Federal de Goiás.

CÉ, N. Utilização de filmes de quitosana contendo nisina e natamicina para cobertura de kiwis e morangos minimamente processados. p. 11–87, 2009.

CEBRIÁN, Guillermo; CONDÓN, Santiago; MAÑAS, Pilar. Physiology of the inactivation of vegetative bacteria by thermal treatments: mode of action, influence of environmental factors and inactivation kinetics. *Foods*, v. 6, n. 12, p. 107, 2017.

CHEN, Y. S. et al. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from jiang-sun (fermented bamboo shoots), a traditional fermented food in Taiwan. ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, v. 90, n. 12, p. 1977–1982, 2010.

CHIKINDAS, M. L. et al. Functions and emerging applications of bacteriocins. ***Current Opinion in Biotechnology***, v. 49, p. 23–28, 2018.

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

COPETTI, Isabela. Bacteriocinas: uma revisão bibliográfica sobre potenciais aplicações terapêuticas e os desafios em torno de seu emprego. 2021

CORDEIRO, C. A. M. et al. Tecnologia De Barreiras Aplicada a Conservação De Pescado. **Ciência e Tecnologia do Pescado: Uma Análise Pluralista - Volume 3**, p. 198–209, 2021.

COSTA, M. C. C. et al. EMBALAGENS DE ALIMENTOS À BASE DE BIOFILMES COMESTÍVEIS: uma revisão de literatura. **Revista Ceuma Perspectivas**, v. 30, n. 2, p. 88, 2019.

COSTA, Sara Patrícia Pereira da. Desenvolvimento e valorização de vegetais desidratados, a partir de excedentes da indústria, com diferentes métodos de secagem: comparação entre o processo de secagem e o processo de liofilização de vegetais. 2021. Dissertação de Mestrado

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. R. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 777–788, 2005.

COUTO, H. Utilização de revestimento comestível contendo amido e nisina na conservação de salada de frutas minimamente processadas. 2016.

DAVIES, E. A. et al. Research note: The effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 186–187, 1998.

DE KWAADSTENIET, M.; DOESCHATE, K. T.; DICKS, L. M. T. Nisin F in the treatment of respiratory tract infections caused by *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 65–70, 2009.

DE OLIVEIRA JUNIOR, A. A. et al. Stability, antimicrobial activity, and effect of nisin on the physico-chemical properties of fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 211, p. 38–43, 2015.

DE SOUZA OLIVEIRA, Ricardo Pinheiro. Purificação de enzimas e peptídeos antimicrobianos: suas aplicações. *Biotecnologia Industrial-Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos*, v. 3, p. 333, 2019

DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 17–22, 1993.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**, p. 91–142, 1994.

DEEGAN, L. H. et al. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1058–1071, 2006.

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

DICKS, L. M. T.; MELLETT, F. D.; HOFFMAN, L. C. Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. **Meat Science**, v. 66, n. 3, p. 703–708, 2004.

DOMINGUEZ OROZCO, Mónica Cecibel. Evaluación del efecto antimicrobiano de la nisina como conservante natural en carne molida especial para hamburguesas. 2020

ENNAHAR, S. et al. Class IIa bacteriocins: Biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 85–106, 2000.

FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação). (2011), O Estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación. Roma, FAO, parte I.

FEITOSA, T. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 162–165, 2003.

FERNÁNDEZ, L. et al. The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during

- lactation. **Journal of Human Lactation**, v. 24, n. 3, p. 311–316, 2008.
- FIELD, D. et al. In vitro activities of nisin and nisin derivatives alone and in combination with antibiotics against *Staphylococcus* biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, 2016.
- FREITAS, L. L. Inativação de *Shigella flexneri* pela associação de nisina e ultrassom (dissertação de mestrado). p. 43, 2017.
- FURTADO, F. B. et al. Chemical composition and bioactivity of essential oil from *blepharocalyx salicifolius*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 2018.
- FUSIEGER, A. Technological Features and Ability to Produce Nisin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* Obtained from Dairy Environment. p. 96, 2019.
- GOMES, Joana Maria Carvalho. Utilização de agentes antimicrobianos naturais como alternativas na conservação e melhoria da qualidade microbiológica de produtos de charcutaria. 2017. Tese de Doutorado.
- GIAMPIETRO, A.; REZENDE-LAGO, N. C. M. Qualidade Do Gelo Utilizado Na Conservação De Pescado Fresco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 505–508, 2009.
- GROSS, E.; MORELL, J. L. The Structure of Nisin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 18, p. 4634–4635, 1971.
- HAYES, K. et al. A novel bioengineered derivative of nisin displays enhanced antimicrobial activity against clinical *Streptococcus agalactiae* isolates. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 19, p. 14–21, 2019.
- HENDERSON, L. O. et al. Nevertheless, She Resisted – Role of the Environment on *Listeria monocytogenes* Sensitivity to Nisin Treatment in a Laboratory Cheese Model. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.
- HOOVER, D. G.; CHEN, H. Bacteriocins and their Food Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 82–100, 2003.
- IAHNKE, A. O. E S. Principais Aspectos De Deterioração Da Qualidade De Pescado E Relação Com a Legislação Brasileira: Uma Breve Revisão. **Ciência e Tecnologia do Pescado: Uma Análise Pluralista - Volume 4**, p. 62–77, 2022.
- JOZALA, A. F. Produção e purificação de nisina produzida por *Lactococcus lactis* em leite desnatado e soro de leite. p. 115, 2009.
- JULIANA MIHO TANABE. EFEITO DO ASPARTATO SOBRE O CRESCIMENTO E FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *Staphylococcus aureus*. p. 6, 2021.
- KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1–3, p. 39–85, 1993.
- KOHATSU, D. S. et al. Aplicação De Biofilme Em Frutos De Ciriguela: Efeito Na Conservação E No Potencial Antioxidante. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 34, n. 2, 2017.
- KOPROVSKI, Naiara Vitoria Ferreira Cortes. Atividade in vitro da Nisina sobre *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. 2021.
- LEISTNER, L.; GOULD, G. W. Hurdle technologies: combination treatment for food stability, safety and quality. *Food Engineering Séries*, KLUWER Academic/Plenum Publishers: New York. p. 194. 2002.
- LIMA, Hallyson Gustavo Guedes de Morais et al. Liofilização de alimentos com forma esferoidal: experimentação, modelagem e simulação. 2021.
- LIMBO, S., PIERGIOVANNI, L., Minimally processed potatoes: Part 2. Effects of high oxygen partial pressures in combination with ascorbic and citric acid on loss of some quality traits. *Postharvest Biology Technology*, v. 43, p. 221–229, 2007.

LUCIANO, Carla Giovana. Desenvolvimento de filmes com atividades antioxidante e antimicrobiana empregando extrato hidroetanólico de folha de pitangueira e nisina ou natamicina. 2020. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MACHADO, A. A. R. et al. Efeito Antioxidante Da *Ilex Paraguariensis* E Condimentos Na Oxidação Lipídica De Filés De *Oreochromis Niloticus*. **Revista Contexto & Saúde**, v. 20, n. 39, p. 35–40, 2020.

MAKHAL, S.; KANAWJIA, S. K.; GIRI, A. Effect of microGARD on keeping quality of direct acidified Cottage cheese. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 936–943, 2015.

MATTICK, A. T. R.; HIRSCH, A.; BERRIDGE, N. J. Further Observations on an Inhibitory Substance (Nisin) From Lactic Streptococci. **The Lancet**, v. 250, n. 6462, p. 5–8, 1947.

MAYER, Debora Mariana Drappé. Controle de patógenos de importância alimentar utilizando ramnolipídeo e óleosina de *Apium graveolens*. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo

MIRANDA, R. Expressão de genes associados a condições de estresse por *Listeria monocytogenes* em interação com *Lactococcus lactis* produtor de nisina. p. 98, 2017.

MOLL, G. N.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J. M. Bacteriocins: Mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 76, n. 1–4, p. 185–198, 1999.

MORENO, I. et al. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 23–28, 1999.

NASCIMENTO, M.; MORENO, I. Bacteriocinas em alimentos : uma revisão. **Braz. J. Food. Technol.**, v. 11, n. 2, p. 120–127, 2008.

OLIVEIRA JUNIOR, Antonio Martins et al. Prospecção Tecnológica: Processo De Liofilização Na Indústria De Alimentos. **Revista Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 3, n. 1, p. 092–102, 2013.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267–276, 2015.

PAIVA, Maykon Jhuly Martins de et al. Influência do uso de biofilmes comestíveis no processo de conservação de abóbora com processamento mínimo. *Hig. aliment*, p. 628-632, 2019.

PARENTE, E.; RICCIARDI, A.; ADDARIO, G. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 14ONWC during batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 388–394, 1994.

PAULIELLO, Rafael Jose. Avaliação do efeito inibitório e da expressão de genes associados à resistência de *Listeria monocytogenes* exposta à nisina nas formas livre e nanoencapsulada em lipossomos de fosfatidilcolina. 2021.

PIPER, C. et al. A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 3, p. 546–551, 2009.

QUICHABA, Michely Bião et al. Avaliação da atividade antibacteriana de nisina e nanopartículas de curcumina frente a bactérias de interesse em alimentos. 2021. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: Premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 6, p. 536–547, 2004.

RIBEIRO, Luma Rossi et al. Pêssego minimamente processado enriquecido com bactérias probióticas. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 9, p. 67683-67698, 2020.

RILEY, M. A. Bacteriocin mediated competitive interactions of bacterial populations and communities. In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. (Eds.). *Prokaryotic antimicrobial peptides*. London: Springer, 2011. p. 13-26.

RIVAS, Paula Marques; SILVA, Danielle Carmo da; TONDO, Eduardo Cesar. Transferência de *Listeria monocytogenes* durante fatiamento mecânico de queijo mussarela. Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada (13.: 2021: Porto Alegre). Anais. Porto Alegre: UFRGS, 2021., 2021

ROGERS, L. A. the Inhibiting Effect of *Streptococcus Lactis* on *Lactobacillus Bulgaricus*. **Journal of Bacteriology**, v. 16, n. 5, p. 321–325, 1928.

ROOMIANI, L. et al. Effect of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil and Nisin on *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* in a Food Model System. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 26, n. 10, p. 1189–1198, 2017.

ROZENTAL, T. et al. Ocorrência de *Coxiella burnetii* em queijo Minas artesanal de leite cru: resultados preliminares de um preocupante problema de saúde pública. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 28, n. 5, p. 85–91, 2018.

SAHA, S. et al. Increased ROS Generation: Implication in Antibacterial Activity of *Evovulus nummularius* against Multidrug Resistant Gram Negative Bacterial Strains. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 1, p. 100–107, 2017.

SALOTTI, B. M. et al. Qualidade Microbiológica Do Queijo Minas Frescal Comercializado No Município De Jaticabal, Sp, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 171–175, 2006.

SÁNCHEZ-MARTÍN MARÍA-ALMUDENA, SALGADO-CALVO MARÍA-TRÁNSITO, S.-M.-; HERNÁNDEZ ÁNGELA, PACHÓN-JULIÁN JESÚS, RODRÍGUEZ-BARBERO EMILIOB, P.-M.; MARÍA-ROSARIO, C.-L. P. Nisina (N 234), aditivo utilizado como conservante en alimentos. **Gac Med Bilbao**, v. 116, n. 3, p. 166–173, 2019.

SILVA, Selma Eufrasio Durante da. Biofilme com incorporação de nisina: aplicação em salsicha. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SOUZA PINTO, F. G. et al. Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 191-198, 2020.

SHIN, J. M. et al. Biomedical applications of nisin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 6, p. 1449–1465, 2016.

SILVEIRA, M. A. Nitrosaminas E Câncer : Efeitos Biológicos Da Carne Curada. p. 29, 2019.

SOUZA, N.; CONTESSA, C. R.; GONÇALO, G. B. Produção De Filmes Bioativos Através Da Adição De Bacteriocina, 2017.

TAVARES, A. B. et al. Queijo Artesanal Produzido No Sul Do Rio Grande Do Sul: Avaliação Físico-Química, Microbiológica E Suscetibilidade a Antimicrobianos De Isolados De *Staphylococcus Coagulase Positiva*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, 2019.

THAKUR, Meenakshi; ASRANI, Rajesh Kumar; PATIAL, Vikram. *Listeria monocytogenes*: A food-borne pathogen. In: *Foodborne diseases*. Academic Press, 2018. p. 157-192

TOLEDO, M. M. Crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCK 400 e produção de nisina em meio a base de extratos vegetais. 2000. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000

TORTORA, G.J. et al. *Microbiologia*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 827p., 2000.

TROVÃO, T. Eficácia in vitro de dois veículos de administração tópica de nisina a Enterococci isolados de cães com doença periodontal. 2017.

UBAQUE BELTRAN, C. Inclusión de aceite esencial de orégano y nisina encapsulados en biorecubrimiento

comestible a partir de quitosano como alternativa de conservación en carne de hamburguesa de res. p. 1–167, 2020.
WHITEHEAD, H. R. A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. **Biochemical Journal**, v. 27, n. 6, p. 1793–1800, 1933.

VIDUEDO, Alecssandra de Fátima Silva. Mastite lactacional: registro baseado em evidências. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2015.

VESSONI PENNA, T.C, MORAES, D.A., and FAJARDO, D.N. Outgrowth kinetic parameters of activated *Bacillus cereus* spores in cooked rice and in milk with nisin added. *J. Food. Protect.*, vol. 65, p. 419-422, 2002.

YANG, S. C. et al. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. MAY, 2014.

ZHANG, Q. Q. et al. Comparative antibacterial and antibiofilm activities of garlic extracts, nisin, ϵ -polylysine, and citric acid on *Bacillus subtilis*. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 11, 2019.