

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

MURIELLE FERREIRA DE MORAIS

**INIBIÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM SALSICHA POR
Leuconostoc mesenteroides ISOLADA DE GRÃOS DE KEFIR**

**Belo Horizonte - MG
2015**

MURIELLE FERREIRA DE MORAIS

**INIBIÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM SALSICHA POR
Leuconostoc mesenteroides ISOLADA DE GRÃOS DE KEFIR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Área de Concentração: Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Afonso de Liguori Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Roseane Batitucci
Passos de Oliveira

**Belo Horizonte - MG
2015**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS - PPGCA

MURIELLE FERREIRA DE MORAIS

**INIBIÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM SALSICHA POR
Leuconostoc mesenteroides ISOLADA DE GRÃOS DE KEFIR**

TESE APROVADA EM 28 DE MAIO DE 2015

COMISSÃO EXAMINADORA


Prof. Dr. AFONSO DE LIGUORI OLIVEIRA
Orientador e Presidente da Comissão


Prof. Dr. TADEU CHAVES DE FIGUEIREDO


Profa. Dra. INAYARA CRISTINA ALVES LACERDA


Profa. Dra. ROSEANE BATITUCCI PASSOS DE OLIVEIRA
Coorientadora

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus queridos Murilo, Maria
Luíza, Maísa e Davi, minha base.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde, força, fé e tudo o que sou. Por ser o alicerce que me sustenta em todos os momentos.

Aos meus pais, Murilo e Luíza, pela criação, cuidado, carinho, ensinamentos e exemplos mais fortes na vida. Sem vocês, com toda a certeza, eu não seria a mesma.

À minha irmã, Maísa, por ser a minha companheira tão esperada e cúmplice de toda uma vida. Pelo presente mais recente em nossas vidas, um anjo, Davi.

Ao Renato, pela doação, segurança, amor, cumplicidade, força e estímulos em todos os momentos, incondicionalmente.

À Marlene, pelo acolhimento, carinho, dedicação, amizade e por ser a minha família quando eu mais precisei.

Aos professores, Afonso de Liguori Oliveira e Roseane Batitucci Passos de Oliveira, pelas orientações, direcionamentos, ensinamentos, paciência, dedicação e por me transmitirem os conhecimentos necessários para me tornar uma pesquisadora. A vocês, presto todo o meu respeito e admiração.

Ao professor Ivan Barbosa Machado Sampaio, pela disponibilidade e prontidão nas análises estatísticas do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA), por oportunizar o Mestrado e toda a estrutura necessária para a sua realização.

Aos professores e funcionários do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia (FAFAR), pelos ensinamentos e contribuições.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise (LAMIB) e Microbiologia de Alimentos (MICROAL), por todos os momentos divididos de alegrias, frustrações, descontrações, muito trabalho e, principalmente, amizade e companheirismo.

Ao Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária e seus funcionários, pela infraestrutura e disponibilidade.

Aos membros da banca examinadora, professores Inayara Cristina Alves Lacerda e Tadeu Chaves de Figueiredo, pela disponibilidade, participação, contribuição e enriquecimento do trabalho.

À Let, por toda a amizade incondicional, estímulo, parceira de grandes momentos vividos, minha torcedora preferida. Você é um dos motivos por eu estar aqui hoje.

À Vanessa, minha grande amiga. Deus não te colocou em meu caminho por acaso. Agradeço por tudo; minha vida ficará um pouco mais vazia com a sua ausência.

À Elaine, por ter se tornado uma grande amiga, companheira e parceira de ótimos momentos de trabalho e descontração. Ficaré guardada em meu coração!

À Lígia, pela amizade e parceria. Agradeço a contribuição para o início do meu trabalho, pela ajuda constante e troca de experiências.

À Fernanda e sua família, por todos os momentos divididos de amizade, carinho, apoio e ajuda constante.

À Sarah, Amanda, Bruna e Larissa, pelo convívio familiar. Vocês deixaram um pouco de vocês em mim.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Instituto Federal de Minas Gerais (IFMG), pelo consentimento da licença e por ser o meu lar querido.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Algumas cepas de bactérias ácido-láticas (BAL) produzem substâncias com capacidade de controlar/inibir microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, como *Listeria monocytogenes*. Neste estudo, 12 cepas de BAL isoladas de kefir, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* foram avaliadas numa 1ª etapa (fase 1) por meio de testes de atividade inibitória pelo método *Spot-on-the-lawn* e pelo método Difusão em poços, resultando na pré-seleção de quatro BAL. Estas foram avaliadas quanto ao potencial inibitório frente a quatro cepas de *L. monocytogenes* de diferentes sorotipos (1/2a, 4a, 4b e uma cepa isolada de salsicha). A cepa de BAL que apresentou halos de inibição mais expressivos foi *Leuconostoc mesenteroides*, e o sorotipo de *L. monocytogenes* com maior sensibilidade foi o 4b. Em uma 2ª etapa (fase 2), amostras de salsichas, esterilizadas por irradiação, foram inoculadas isoladamente ou em combinação com as cepas de *Leuconostoc mesenteroides* e *L. monocytogenes* 4b, e também nisina comercial, constituindo os tratamentos BL (*L. monocytogenes*), BLN (*L. monocytogenes* e nisina), BLB (*L. monocytogenes* e *L. mesenteroides*) e BB (*L. mesenteroides*). Nos tratamentos, foram avaliadas as atividades inibitórias da cepa de BAL e da nisina comercial (Nisaplin®) frente à *Listeria monocytogenes*; armazenadas sob refrigeração a 10°C e analisadas em cinco momentos (início, 1ª, 2ª, 4ª e 8ª semana). Estas amostras, no início, apresentaram médias de contagens de *L. monocytogenes* de 2,77 log UFC.g⁻¹ em BL, 1,55 log UFC.g⁻¹ em BLN, 2,66 log UFC.g⁻¹ em BLB, sendo a contagem de *L. mesenteroides* em BB de 6,1 log UFC.g⁻¹. Durante o período de estocagem, as contagens de *L. monocytogenes* aumentaram. Porém, no tratamento BLB, observou-se uma menor elevação das contagens (p<0,05), sendo a variação observada de 5,90 log UFC.g⁻¹, 7,14 log UFC.g⁻¹ e 2,73 log UFC.g⁻¹ para BL, BLN e BLB, respectivamente, ao final do período de armazenamento. Desde a 2ª semana até o final do período de estocagem, a atividade inibitória da cepa de *L. mesenteroides* foi superior à da nisina comercial. Esses resultados sugerem que *L. mesenteroides* selecionado do kefir tem potencial promissor na biopreservação, pela capacidade de produção de substâncias inibitórias (similares a bacteriocinas), com efeito antagonista frente a cepas de *L. monocytogenes*, superior, inclusive, à da nisina comercial em salsicha.

Palavras-chave: Salsichas, BAL, *L. monocytogenes*, *L. mesenteroides*, inibição.

ABSTRACT

Some strains of lactic acid bacteria (LAB) have the ability to produce antimicrobial substances that control/inhibit spoilage microorganisms and/or pathogens, such as *Listeria monocytogenes*. In this study, 12 LAB strains isolated from kefir, belonging to the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Leuconostoc* were evaluated in a 1st stage (stage 1) through inhibitory activity tests by Spot-on-the-lawn method and well diffusion assay, resulting in pre-selection of four LAB. These LAB were evaluated for inhibitory potential against four strains of *L. monocytogenes* from different serotypes (1/2a, 4a, 4b and an isolated sausage strain). The LAB strain *Leuconostoc mesenteroides* showed the highest inhibition halo, and *L. monocytogenes* serotype with the highest sensitivity was 4b. In a 2nd stage (stage 2), samples of sausages, sterilized by irradiation, were inoculated with *L. mesenteroides* and *L. monocytogenes* 4b strains (alone or in combination), and also commercial nisin (Nisaplin®) resulting in BL (*L. monocytogenes*), BLN (*L. monocytogenes* and Nisin), BLB (*L. monocytogenes* and *L. mesenteroides*) and BB (*L. mesenteroides*) treatments, which were used to evaluate BAL strain and commercial nisin (Nisaplin®) inhibitory activity against *L. monocytogenes*. The samples were stored under refrigeration at 10° C and analyzed in five times (first, 1st, 2nd, 4th and 8th week). These samples, at first, showed means of *L. monocytogenes* counts of 2.77 log CFU g⁻¹ in BL, 1.55 log CFU g⁻¹ in BLN, 2.66 log CFU.g⁻¹ in BLB, and *L. mesenteroides* count of 6.1 log CFU g⁻¹ in BB. During storage period, *L. monocytogenes* counts increased. However, BLB treatment revealed a smaller increase in counts ($p < 0.05$) with an observed variation of 5.90 log CFU g⁻¹; 7.14 log CFU g⁻¹ and 2.73 log CFU g⁻¹ to BL, BLN and BLB, respectively. From the 2nd week to the end of the storage period, the inhibitory activity of *L. mesenteroides* strain was higher than that of commercial nisin. These results suggest that *L. mesenteroides*, selected from kefir, have promising potential in bio preservation, by inhibitory substances (similar to bacteriocins) production capacity with antagonistic effect against strains of *L. monocytogenes*, superior even to commercial nisin, in some ready-to-eat sausage-like products.

Keywords: sausages, LAB, *L. monocytogenes*, *L. mesenteroides*, inhibition.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Teores de composição do Kefir.....	21
Quadro 2 - Padrão microbiológico para salsicha.....	34
Quadro 3 - Regulamentação sobre limite máximo permitido de <i>L. monocytogenes</i> em alimentos para alguns países.....	40
Quadro 4 - Cepas de bactérias lácticas isoladas do kefir utilizadas neste estudo.....	46
Quadro 5 - Cepas de <i>L. monocytogenes</i> utilizadas neste estudo.....	46
Quadro 6 - Inoculação dos tratamentos.....	56
Quadro 7 - Coeficientes de variação e médias gerais dos valores de halos de inibição (mm) de BAL sobre cepas de <i>L. monocytogenes</i> pelo método <i>Spot-on-the-lawn</i> - teste de atividade inibitória direta.....	62
Quadro 8 - Resultados da inoculação e recuperação (UFC.g ⁻¹) das cepas de BAL e <i>L. monocytogenes</i> nas marcas de salsicha.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabólitos produzidos por BAL e seu efeito inibitório sobre outros microrganismos em placas (halos de inibição)	25
Figura 2 - Coloração de Gram de <i>L. monocytogenes</i> 4b e teste de motilidade.....	49
Figura 3 - Preparação das amostras experimentais de salsicha em embalagem plástica.....	53
Figura 4 - Esquema ilustrativo da inoculação dos tratamentos.....	56
Figura 5 - Modelo ilustrativo da análise de recuperação e contagem microbiana.....	58
Figura 6 - Colônias de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 9U2 em MRS e colônias de <i>L. monocytogenes</i> 4b em Palcam.....	59
Figura 7 - Crescimento das colônias de BAL e sua atividade antimicrobiana contra cepa de <i>L. monocytogenes</i> 4b por método <i>Spot-on-the-lawn</i> do teste de atividade inibitória direta.....	65
Figura 8 - Valores das médias dos halos de inibição (em mm) de cada cepa de BAL dentro de cada cepa de <i>L. monocytogenes</i>	65
Figura 9 - Atividade antimicrobiana dos sobrenadantes livres de células obtidos de BAL contra cepa de <i>L. monocytogenes</i> 4b por método Difusão em poços.....	70
Figura 10 - Comportamento dos tratamentos a partir das médias das contagens de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC.g ⁻¹) ao longo do período de armazenamento.....	80
Figura 11 - Comportamento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 9U2 pelas médias das contagens da BAL (log UFC.g ⁻¹) durante o período de armazenamento.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores das médias dos halos de inibição (mm) de BAL sobre cepas de <i>L. monocytogenes</i> pelo método <i>Spot-on-the-lawn</i> - teste de atividade inibitória direta.....	63
Tabela 2 - Atividade inibitória indireta dos sobrenadantes livres de células obtidos de BAL sobre cepas de <i>L. monocytogenes</i> pelo método Difusão em poços.....	68
Tabela 3 - Resultados das contagens dos inóculos das cepas de BAL <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 9U2 e <i>L. monocytogenes</i> 4b.....	73
Tabela 4 - Concentração inicial e variações observadas nas médias das contagens de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC.g ⁻¹) entre os tratamentos nos diferentes intervalos de tempo.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC: *American Type Culture Collection* (Coleção de Culturas tipo Americana)
BAL: Bactéria Láctica
BB: Bloco do tratamento com bactéria láctica
BHI: *Brain Heart Infusion* (Infusão cérebro-coração)
BL: Bloco do tratamento com *Listeria monocytogenes*
BLB: Bloco do tratamento com *Listeria monocytogenes* e *L. mesenteroides*
BLN: Bloco do tratamento com *Listeria monocytogenes* e nisina comercial
B.O.D.: *Biochemical Oxygen Demand* (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
BPA: Boas Práticas Agropecuárias
BPF: Boas Práticas de Fabricação
CDTN: Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
DIPOA: Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
DETEN: Departamento Técnico-Normativo da Secretaria de Vigilância Sanitária
EC: *European Community* (Comunidade Europeia)
ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control* (Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças)
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos)
EUA: Estados Unidos da América
FAFAR: Faculdade de Farmácia da UFMG
GRAS: *Generally Recognized As Safe* (Normalmente reconhecido como seguro)
FAO: *Food and Agriculture Organization* (Organização de Agricultura e Alimentação)
FAT: Fundação André Tosello
FDA: *United States Food and Drug Administration* (Administração de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos)
Fiocruz: Fundação Oswaldo Cruz
ICB: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
ICMSF: *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (Comissão Internacional em Especificações Microbiológicas para Alimentos)
INS: International Numbering System (Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares)
KABH: Kefir de Água de Belo Horizonte
KACU: Kefir de Água de Curitiba
KASA: Kefir de Água de Salvador
KAVI: Kefir de Água de Viçosa
kGy: *Kilogray* (quilogray)
KLCU: Kefir de Leite de Curitiba
KLDI: Kefir de Leite de Divinópolis
KLSA: Kefir de Leite de Salvador
KLVI: Kefir de Leite de Viçosa
LEFM: Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos
LGMP: Laboratório de Genética Molecular de Protozoários e Parasitas
LTDA: Limitada

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MICROAL: Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia
MRS: de Man, Rogosa, Sharpe
MS: Ministério da Saúde
Nº: Número
NAGE: Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica
OMS: Organização Mundial da Saúde
PPM: Partes por milhão
PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia de Polimerase)
PPHO: Procedimentos-Padrão de Higiene Operacional
PVC: *Polyvinyl chloride* (Policloreto de vinila)
RDC: Resolução de Diretoria Colegiada
RTE: *Ready-to-eat* (Alimentos prontos para o consumo)
SCOTS: *Selective Capture Of Transcribed Sequences* (Captura Seletiva de Sequências Transcritas)
SCF: Sobrenadante Concentrado Filtrado
SCNF: Sobrenadante Concentrado Neutralizado Filtrado
SDA: Secretaria de Defesa Agropecuária
SF: Sobrenadante Filtrado
SIF: Serviço de Inspeção Federal
SIM: *Sulphur Indol Motility* (Ágar Indol Sulfeto Motilidade)
SNC: Sistema Nervoso Central
SNF: Sobrenadante Neutralizado Filtrado
UE: União Europeia
UFC: Unidades Formadoras de Colônias
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
UI: Unidade Internacional
WHO: *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE SÍMBOLOS

®: *Registered* (registrado)

™: *Trade Mark* (marca registrada)

%: porcentagem

μL: microlitro

μm: micrômetro

°C: graus Celsius

CO₂: dióxido de carbono

cm: centímetro

g: grama (unidade de medida de massa)

g: gravidade (unidade de medida de rotação)

g⁻¹: por grama

h: horas

Kg: quilo

L: litro

M: molar

mg: miligrama

mL: mililitro

mL⁻¹: por mililitro

mm: milímetro

m/m: massa por massa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivos específicos.....	20
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 Kefir.....	21
3.2 Bactérias Ácido-Láticas (BAL).....	23
3.2.2 Gênero <i>Leuconostoc</i>	26
3.2.3 Bacteriocinas e outras substâncias antimicrobianas	27
3.2.3.1 Nisina	29
3.3 Salsicha.....	32
3.4 <i>Listeria</i>	34
3.4.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	35
3.4.2 Listeriose	37
3.4.3 <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos	39
3.4.3.1 <i>Listeria monocytogenes</i> em salsicha.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 Material.....	45
4.1.1 Cepas de bactérias lácticas	45
4.1.2 Cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	45
4.1.3 Amostras de salsicha	47
4.1.4 Nisina comercial	47
4.2 Métodos.....	47
4.2.1 Ativação das culturas lácticas	47
4.2.2 Ativação das cepas de <i>L. monocytogenes</i>	48
4.2.3 Preparo da nisina comercial	49
4.2.4 Análises <i>in vitro</i>	50
4.2.4.1 Testes de antagonismo	50
4.2.4.1.1 Teste de atividade inibitória direta - <i>Spot-on-the-lawn</i>	50
4.2.4.1.2 Obtenção de sobrenadante livre de células	51
4.2.4.1.3 Teste de atividade inibitória indireta – Difusão em poços.....	52
4.2.5 Análises <i>in situ</i>	52
4.2.5.1 Preparação das amostras de salsichas.....	52
4.2.5.2 Irradiação das amostras de salsichas	53
4.2.5.3 Preparação dos inóculos selecionados e aplicação da solução de Nisaplin®.....	54
4.2.5.3.1 BAL selecionada.....	54

4.2.5.3.2 <i>Listeria monocytogenes</i> selecionada.....	54
4.2.5.3.3 Aplicação da solução de Nisaplin®	55
4.2.5.4 Inoculação dos tratamentos	55
4.2.5.5 Análises de recuperação e contagem microbiana	57
4.2.5.6 Teste de esterilidade das amostras.....	59
4.3 Análises estatísticas	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Fase 1	61
5.1.1 Análises <i>in vitro</i>	61
5.1.1.1 Seleção das 4 cepas de BAL	61
5.1.1.2 Teste de atividade inibitória direta por método <i>Spot-on-the-lawn</i>	62
5.1.1.3 Sobrenadantes livres de células neutralizados e filtrados	66
5.1.1.4 Teste de atividade inibitória indireta por método Difusão em poços.....	67
5.2 Fase 2	70
5.2.1 Análises <i>in situ</i>	71
5.2.1.1 Seleção da marca de salsicha.....	71
5.2.1.2 Inoculação nas amostras de salsichas	72
5.2.1.2.1 Quantificação dos inóculos das cepas de <i>L. monocytogenes</i> 4b e <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 9U2.....	73
5.2.1.2.2 Quantificação das populações de <i>L. monocytogenes</i> e de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> por análises de recuperação.....	74
5.2.1.3 Avaliação da viabilidade de <i>L. monocytogenes</i>	74
5.2.1.4 Avaliação da viabilidade de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	80
5.2.1.5 Teste de esterilidade das amostras de salsicha	82
6. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1. INTRODUÇÃO

Embora nos últimos anos a segurança alimentar seja uma prioridade, a indústria de carnes vem enfrentando grandes mudanças impulsionadas pelas exigências dos consumidores por alimentos "naturais", nutritivos, de preparo fácil e rápido, denominados prontos para o consumo ou *ready-to-eat* (RTE). A salsicha é um dos produtos que melhor representa esse grupo, e um dos embutidos mais comercializados no Brasil.

O grande volume de salsicha consumido no País justifica-se pelo baixo preço do produto quando comparado às carnes *in natura*, a praticidade/conveniência de sua apresentação - condimentada e pasteurizada, embalada a vácuo e pronta para o uso no preparo de lanches/refeições. Essas características a tornaram bastante popular, sendo o cachorro-quente muito comercializado em diversos tipos de serviços de alimentação (lojas, quiosques, carrinhos de cachorro-quente) do mundo inteiro.

O processo de abate necessário à obtenção da carne e de seus produtos derivados condiciona as carnes à presença inevitável de microrganismos, uma vez que estão distribuídos por toda parte, sendo encontrados nas áreas de criação (fazendas, granjas etc.), nos pelos, penas e pele dos animais, em todo o trato gastrointestinal e até mesmo no ambiente industrial. Neste sentido, embora essas fontes de contaminação sejam sempre controladas por meio de programas de qualidade - Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e de Fabricação (BPF), Procedimentos-Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) - a contaminação das carcaças, das carnes e dos produtos derivados prontos para o consumo ocorre.

Esses microrganismos, tanto os deterioradores quanto os patogênicos, podem causar grandes prejuízos para as indústrias de alimentos (perdas de produto por descarte) ou mesmo afetar a saúde dos consumidores, podendo, inclusive, nos casos mais graves e para certos grupos de risco (crianças, imunocomprometidos, gestantes, recém-nascidos e idosos) serem fatais. Mesmo com todo o conhecimento existente sobre as medidas higiênicas e sanitárias para a garantia de inocuidade e segurança alimentar, os surtos das doenças transmitidas por alimentos (DTA) vêm

aumentando em todo o mundo, inclusive em países mais desenvolvidos, como os Estados Unidos e na Europa.

Dentre os microrganismos causadores de DTA, continua tendo destaque *Listeria monocytogenes*, que é um dos principais patógenos envolvidos em surtos pelo consumo de produtos de origem animal. Pode causar listeriose, com quadros de gravidade variável, sendo os mais afetados as crianças, idosos, gestantes e pessoas imunocomprometidas.

Produtos prontos para o consumo, como as salsichas, podem ser contaminados em toda a cadeia produtiva e até mesmo no momento de preparo, por contaminações cruzadas. Embora o processo de cozimento/pasteurização das salsichas elimine *Listeria*, o produto pode sofrer recontaminação, em especial, durante a etapa de embalagem. Nesses casos, o sorotipo mais comumente encontrado é o 4b, que já foi isolado de salsichas hot dog (WALLACE *et al.*, 2003; PETTINATI, TELLES e BALLIAN, 2006; CESAR *et al.*, 2011), no varejo, em embalagens a vácuo e a granel.

Um estudo estimou que 1,6% dos pacotes de salsichas são contaminados por *L. monocytogenes* em instalações de processamento nos EUA (WALLACE *et al.*, 2003).

A presença de *L. monocytogenes* em salsichas tem preocupado o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que, em 2009, visando monitorar e assegurar a inocuidade desse produto, instituiu os Procedimentos de Controle de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo, através da Instrução Normativa nº 09 (BRASIL, 2009).

L. monocytogenes tem grande capacidade de adaptação e de crescimento, mesmo em baixas temperaturas, como as preconizadas pelos fabricantes de salsicha, que recomendam a estocagem refrigerada em temperaturas de até +10°C, podendo, nessas condições, se desenvolver durante o período de armazenamento do produto. Além disso, as instruções de preparo da salsicha para o consumo não recomendam o cozimento ou fervura, mas apenas um aquecimento prévio, o que resulta em maior risco de transmissão da listeriose e à saúde dos consumidores, no caso de o microrganismo estar presente no produto.

Assim, outras estratégias de intervenção são necessárias a fim de garantir a segurança microbiológica de produtos cárneos prontos para o consumo,

como a utilização de agentes antimicrobianos. Uma alternativa segura e viável é a biopreservação, que, baseada no uso de microrganismos e seus metabólitos, como as bacteriocinas, propõe controlar e combater os microrganismos indesejáveis nos alimentos, além de ser uma forma de reduzir a necessidade/uso de aditivos e de conservantes.

2. OBJETIVOS

Avaliar a atividade inibitória de bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas de grãos de Kefir na inibição de cepas de *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) em salsichas.

2.1 Objetivos específicos

- a) Selecionar, *in vitro*, entre as cepas de BAL obtidas a partir de isolados de grãos de Kefir, a que apresenta melhor antagonismo por método direto e indireto frente às diferentes cepas de *L. monocytogenes*;
- b) comparar os dados obtidos da atividade inibitória da BAL selecionada e da nisina comercial frente à cepa de *L. monocytogenes*, *in situ*;
- c) estabelecer curvas de crescimento para *L. monocytogenes* nos diferentes tempos de armazenamento do produto, quantificando o crescimento desse microrganismo sob refrigeração;
- d) verificar a viabilidade e sobrevivência da BAL inoculada nas amostras de salsicha durante todo o período de vida útil do produto.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Kefir

Originário das montanhas do Cáucaso (ALTAY *et al.*, 2013), o kefir é um leite fermentado produzido pela ação de bactérias do ácido láctico, bactérias do ácido acético e leveduras, ligadas em uma matriz complexa de polissacarídeos e proteínas (VINDEROLA *et al.*, 2005).

O kefir é definido de acordo com suas características, microrganismos, conteúdo e forma de fabricação. É uma bebida fermentada, viscosa, de coloração esbranquiçada, de corpo suave, ligeiramente efervescente, levemente alcoólica, refrescante e ácida (ALSAYADI *et al.*, 2013).

Segundo a Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007, do MAPA (BRASIL, 2007), que estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, o kefir é definido como “leite fermentado, cuja fermentação se realiza com cultivos ácido-lácticos elaborados com grãos de Kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de Kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus* e *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*”.

No Quadro 1, são demonstrados os teores-limite da composição do Kefir.

Quadro 1 - Teores de composição do Kefir

Substâncias	Níveis
Proteína do leite (% m/m) ^a	Mínimo 2,7%
Gordura do leite (% m/m)	Menor que 10%
Acidez titulável expressa em % de ácido láctico (% m/m)	Mínimo 0,6%
Somatório de microrganismos constituintes da cultura iniciadora (UFC/g em total)	Mínimo 10 ⁷
Leveduras (UFC/g)	Mínimo 10 ⁴

^a – O teor de proteína é de 6,38 multiplicado pelo nitrogênio total determinado por Kjeldahl.
Fonte: FAO/WHO, 2011

O kefir é produzido a partir da fermentação de leites de diferentes tipos, como de vaca, ovelha, cabra, camela, búfala e outros substitutos, entre eles leite de coco, leite de soja e leite de arroz. O leite pode ser pasteurizado ou não, integral, desnatado ou com baixo teor de gordura, e sua elaboração pode ser realizada de forma industrial ou artesanal, este último caracterizado como o método autêntico (ALTAY *et al.*, 2013).

O kefir pode ser produzido a partir de outros meios de fermentação e obtido a partir de fonte de carboidratos, denominado kefir de água. Sua elaboração é caseira, com base na adição de grãos de kefir em solução de açúcar e água, figos secos e, geralmente, limão. Diferencia-se do kefir de leite de acordo com o substrato e grãos de kefir, composição microbiana, tipos de cepas existentes, forma e cor (ALSAYADI *et al.*, 2013). Seu sabor e aroma são levemente adocicados, suavemente alcoólico, frutado e ácido (LAUREYS E DE VUYST, 2014).

O kefir contém muitas substâncias funcionais (ALSAYADI *et al.*, 2013), devido à capacidade que os produtos lácteos fermentados possuem de produzir um grande número de efeitos terapêuticos e fisiológicos, como a estimulação do sistema imunológico. Este mecanismo é exercido pelas bactérias ácido-láticas presentes nestes produtos, consideradas probióticas (VINDEROLA *et al.*, 2005).

O termo probiótico significa “para a vida” e é definido como microrganismos vivos, bactérias que, quando consumidas em quantidades adequadas como parte dos alimentos, conferem benefícios à saúde do hospedeiro - seres humanos ou animais. Para serem utilizados nos alimentos, esses microrganismos devem ser certificadamente seguros, capazes de sobreviver à passagem pelo trato digestivo e de se proliferar no intestino (FAO/WHO, 2001).

Vários benefícios à saúde foram atribuídos ao consumo do kefir por causa da grande quantidade de compostos bioativos encontrados, como ácidos orgânicos, CO₂, peróxido de hidrogênio, peptídeos bioativos, etanol, exopolissacarídeos e bacteriocinas, atuando independentemente ou em conjunto (LEITE *et al.*, 2013).

Diversos são os mecanismos de ação dos probióticos para a saúde: no intestino, para o controle de agentes patogênicos, ocorre a produção de substâncias antimicrobianas, exclusão por competição do patógeno vinculado, modulação do sistema imune e competição por nutrientes (FAO/WHO, 2001).

Estudos têm demonstrado que cepas de bactérias ácido-láticas isoladas

do kefir possuem diversas propriedades benéficas (FARNWORTH, 2005; LOPITZ-OTSOA *et al.*, 2006; NIELSEN, GÜRAKAN e ÜNLÜ, 2014), seja *in vitro* (ALSAYADI *et al.*, 2013, CARASI *et al.*, 2014; AUAD, 2014), *in vivo* (RODRIGUES *et al.*, 2005; VINDEROLA *et al.*, 2005; PAIVA, 2013) e *in situ* (FELDMANN, 2015).

3.2 Bactérias Ácido-Láticas (BAL)

Em geral, a percepção das pessoas em relação a microrganismos (bactérias, leveduras e mofo) é negativa, pois eles são associados a agentes causadores de doenças. Muitas pessoas ignoram que diversos microrganismos desempenham importante papel na produção de alimentos e são benéficos para a saúde e o bem-estar humanos, como é o caso das BAL (ADAMS, 1999).

As BAL são microrganismos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formam esporos, com reações de catalase e oxidase negativos. Quanto às exigências nutricionais, são complexas, sendo que a maior parte é altamente dependente da presença de compostos como vitaminas, carboidratos e outros fatores para o seu crescimento (SILVA *et al.*, 2007).

As BAL não possuem um grupo taxonômico precisamente definido, mas estão agrupadas em gêneros relacionados filogeneticamente com particularidades ecológicas e bioquímicas comuns, tais como *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* (ADAMS, 1999) e *Lactosphaera* (JAY, 2005).

O grupo das BAL possui a capacidade de produzir ácido lático a partir de hexoses, e elas se dividem em homofermentativas e heterofermentativas. As BAL homofermentativas são aquelas em que o único ou principal produto final do metabolismo é o ácido lático. Já as que produzem ácido lático na mesma quantidade molar, dióxido de carbono e etanol são chamadas heterofermentativas. As BAL homofermentativas podem extrair energia dobrada para a mesma quantidade de glicose se comparadas às heterofermentativas, e algumas linhagens podem mudar seu caráter homofermentativo sob determinadas condições, tais como concentração de glicose, pH e limitação de nutrientes. As BAL heterofermentativas são mais importantes na área de alimentos por serem produtoras de componentes de aroma e

sabor (acetilaldeído e diacetil) (JAY, 2005).

Alguns compostos produzidos pelas BAL, como ácidos láctico e acético e bacteriocinas têm sido aplicados pela indústria de alimentos no desenvolvimento e conservação de produtos, sendo que a produção de ácidos é importante para o efeito de preservação que as BAL exercem. A preservação de alimentos está relacionada à sensibilidade de diferentes grupos de bactérias a estes ácidos e varia de acordo com fatores intrínsecos (tipo de produto, atividade de água e uso de nitrato/nitrito) (LÜCKE, 2000).

O antagonismo das BAL caracteriza-se pela diminuição de nutrientes, produção de bacteriocinas ou substâncias inibitórias, com diminuição do pH, produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil e outros compostos que produzem um efeito antagônico frente a patógenos e outros microrganismos deterioradores de alimentos (JAY, 2005). As bacteriocinas são consideradas os mais potentes inibidores (Figura 1) (DEEGAN *et al.*, 2006).

O mecanismo geral da interferência microbiana não está totalmente elucidado. Porém, sabe-se que ocorre por meio da competição por nutrientes, competição por sítios de adesão, alteração desfavorável do ambiente e também pela combinação de todos estes (ADAMS, 1999; CAPLICE, FITZGERALD, 1999; JAY, 2005; MEDINA e LAINE, 2011). Segundo Lücke (2000), a utilização de BAL psicotróficas selecionadas pode reduzir o risco de crescimento de patógenos na forma vegetativa e colaborar na inibição de *L. monocytogenes* em produtos cárneos perecíveis, sendo o mais importante mecanismo de ação das culturas de proteção à formação de ácido láctico.

As culturas antagonistas que são adicionadas aos alimentos com o objetivo único de prolongar a vida útil dos produtos ou inibir microrganismos patogênicos são denominadas culturas protetoras. Já a utilização dessas culturas ou dos seus metabólitos, tais como bacteriocinas ou enzimas, recebe a denominação de biopreservação (LÜCKE, 2000).

Para alimentos não fermentados, como é o caso da salsicha, cepas de BAL produtoras de bacteriocinas são utilizadas como culturas protetoras (SETTANNI e CORSETTI, 2008). Há milênios, as BAL têm demonstrado a sua capacidade de controlar a deterioração e microrganismos patogênicos em alimentos, sendo, portanto adequadas para a utilização na biopreservação (AGUILAR e KLOTZ, 2010).

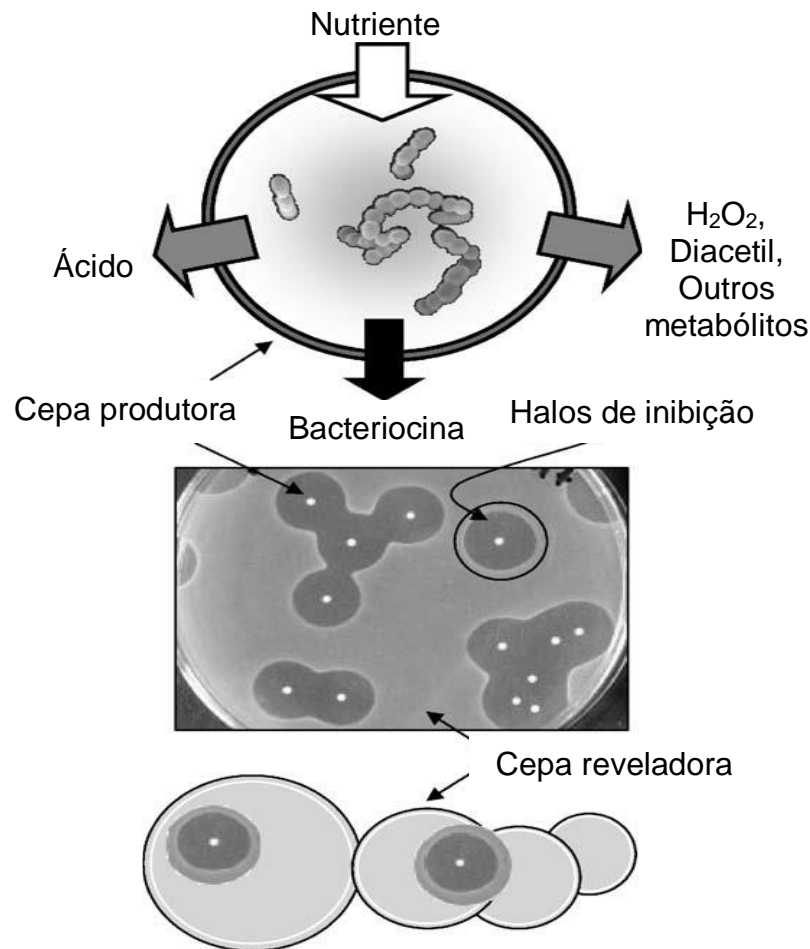


Figura 1: Metabólitos produzidos por BAL e seu efeito inibitório sobre outros microrganismos em placas (halos de inibição)

Fonte: adaptado de Deegan *et al.* (2006)

Várias bactérias lácticas específicas podem ser utilizadas como culturas protetoras, retardando a deterioração provocada por bactérias (BORCH, KANT-MUEMANS e BLIXT, 1996). Segundo Lücke (2000), a adição de microrganismos desejáveis em carnes e/ou produtos cárneos pode ter quatro diferentes finalidades: a) melhorar a segurança (inativação de patógenos); b) melhorar a estabilidade (prolongar a vida de prateleira, inibindo alterações indesejáveis provocadas por microrganismos deterioradores ou reações abióticas); c) promover diversidade (modificação da matéria-prima para obter novas propriedades sensoriais); e d) para proporcionar benefícios para a saúde (por meio de efeitos positivos sobre a microbiota intestinal).

Para Medina e Laine (2011), além de assumirem um importante papel em

vários processos na fermentação de alimentos, as BAL possuem, ainda, outras importantes funções, como a melhoria das propriedades sensoriais de produtos, melhoria da textura em produtos lácteos e até mesmo benefícios à saúde, como no caso dos probióticos.

Para a realização deste estudo, utilizou-se cepas de BAL dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*. No entanto, este último foi o alvo das pesquisas utilizadas e será abordado mais detalhadamente.

3.2.2 Gênero *Leuconostoc*

São cocos Gram-positivos pertencentes ao grupo das bactérias lácticas, catalase-negativos encontrados tipicamente associados aos lactobacilos (JAY, 2005). Suas células apresentam-se sob forma esférica e frequentemente lenticular, e ocorrem em pares ou em cadeias. São heterofermentativas, pois fermentam a glicose, produzindo ácido láctico, etanol e CO₂ (SILVA *et al.*, 2007; FRANCO e LANDGRAF, 2008). São imóveis e têm melhor crescimento em meios neutros ou levemente ácidos. Quanto às exigências nutricionais, requerem, para o seu crescimento, ácidos graxos, aminoácidos, ácidos nucleicos, peptídeos, vitaminas e carboidratos fermentáveis (SILVA *et al.*, 2007).

Nesse grupo, estão inclusas as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas da família Micrococcaceae e os cocos pertencentes aos gêneros *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, além de *Leuconostoc* (FRANCO e LANDGRAF, 2008). A temperatura ideal para o seu crescimento é de 20 a 30°C, com mínima por volta de 5°C, com algumas exceções de espécies psicotróficas, que crescem em temperaturas mais reduzidas. As cepas são aerotolerantes, porém obtêm melhor crescimento em condições de microaerofilia (SILVA *et al.*, 2007).

Leuconostoc pode ser encontrado naturalmente em plantas e derivados, mas também em utensílios de alimentos, trato gastrointestinal e em animais (JAY, 2005)

Segundo Klaenhammer (1993), as bacteriocinas produzidas por *Leuconostoc* são pequenos peptídeos com estabilidade térmica, com exceção da leuconocina S, que é sensível ao calor. Estas bacteriocinas são antagônicas contra

BAL e possuem efeito bactericida em *L. monocytogenes*. Elas podem ter efeito bactericida ou bacteriostático, segundo uma série de fatores, como alterações nas condições ambientais, cepa indicadora e sequência da bacteriocina primária.

Várias bacteriocinas podem ser produzidas por este gênero, como mesentericina Y105, leuconocina S, leucocina A-UALI87, mesenterocina 5 e leucocina A (KLAENHAMMER, 1993).

3.2.3 Bacteriocinas e outras substâncias antimicrobianas

Um microrganismo pode proliferar em um alimento e liberar determinados metabólitos que inibem o crescimento e/ou a sobrevivência de outros microrganismos. Dentre estes metabólitos produzidos, existem algumas substâncias denominadas bacteriocinas, que apresentam atividade bactericida (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

As bacteriocinas são peptídeos produzidos por microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo que, para a indústria de alimentos, apenas as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas são relevantes na biopreservação (BARROS, KUNIGK e JURKIEWICZ, 2010). Segundo Gálvez *et al.* (2007), bacteriocinas são peptídeos ribossomicamente sintetizados ou proteínas com atividade antimicrobiana, produzidas por diferentes grupos de BAL com amplo espectro de inibição.

Algumas bacteriocinas mostram efeitos aditivos e/ou sinérgicos quando combinadas com outros agentes antimicrobianos, como conservantes químicos, compostos fenólicos ou outras proteínas antimicrobianas. Pode-se utilizar ainda a combinação de diferentes bacteriocinas para evitar o desenvolvimento de cepas resistentes. Esta combinação, aliada a tratamentos físicos, também oferece boas oportunidades para a conservação de alimentos como tecnologia de obstáculos, fornecendo uma barreira adicional a formas mais resistentes, como os esporos bacterianos (GÁLVEZ *et al.* 2007).

Os estudos sobre a inocuidade do uso das bacteriocinas em alimentos são conduzidos pelas etapas: a) isolamento da bactéria de um alimento; b) seleção para a produção da bacteriocina; c) caracterização da bacteriocina; d) produção da bacteriocina em modelos alimentares; e) aplicação no alimento propriamente dito

(SETTANNI e CORSETTI, 2008).

A eficácia das bacteriocinas, no entanto, depende de diversos fatores ambientais, como pH, temperatura, composição, estrutura do alimento e a microbiota existente nele. Os alimentos devem ser considerados como complexos ecossistemas em que as interações microbianas podem ter uma grande influência sobre o equilíbrio microbiano e a proliferação de bactérias benéficas ou prejudiciais (GÁLVEZ *et al.*, 2007).

As bacteriocinas produzidas por BAL podem ter diversas aplicações desejáveis na conservação de alimentos, pois englobam fatores como: não são tóxicas, são reconhecidas como seguras, são inativadas por proteases digestivas, possuem amplo espectro antimicrobiano contra patogênicos e bactérias deterioradoras, são termotolerantes, possuem efeito bactericida, não apresentam resistência com antibióticos e seus determinantes genéticos facilitam a sua manipulação genética (GÁLVEZ *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação das bacteriocinas está ligado à porção proteica, que é essencial para sua atividade (FRANCO e LANDGRAF, 2008), e, na maioria das vezes, ele é codificado por plasmídeos (JAY, 2005). Na área de alimentos, o maior interesse é pelas BAL que podem produzir uma ou mais bacteriocinas diferentes. Algumas bacteriocinas são proteínas simples, outras são compostas por lipídios e açúcares (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Os conservantes químicos artificiais são utilizados pelas indústrias alimentícias como meio para conservar os alimentos e impedir o crescimento de microrganismos. Porém, o fato de os consumidores estarem cada vez mais conscientes sobre os riscos da saúde associados ao consumo destes aditivos tem proporcionado o aumento de pesquisas sobre a utilização de bacteriocinas produzidas por BAL como método de conservação (ABEE, KROCKEL E HILL, 1995).

A produção de bacteriocinas por BAL pode oferecer vantagens para a indústria de alimentos, sendo um instrumento de controle de microrganismos indesejáveis, como os patogênicos e deterioradores, de uma forma mais natural e atraente para os consumidores. Porém, para potenciais aplicações alimentares, pesquisas com a finalidade de determinar os métodos do processamento e o impacto dos componentes dos alimentos sobre a estrutura, a solubilidade e a

atividade das bacteriocinas são de grande importância (DEEGAN *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, muitos estudos têm mostrado um grande número de bacteriocinas obtidas de cultivos de bactérias lácticas (KLAENHAMMER, 1993; ENNARHAR *et al.*, 2000; DEVLIEGHERE, VERMEIREN e DEBEVERE, 2004; OLIVEIRA, 2008). Uma das mais pesquisadas é a nisina, a primeira a ter sua estrutura elucidada e que, atualmente, tem seu uso aprovado como aditivo alimentar em diversos países (DELVES-BROUGHTON, 2005).

3.2.3.1 Nisina

A nisina é produzida naturalmente pelo *Lactococcus lactis subs. lactis* durante a fase de crescimento exponencial (fermentação) e cessa sua produção quando a fase estacionária é alcançada. A temperatura, o pH e a composição do meio de cultura são as principais variáveis que afetam a sua produção (GUERRA *et al.*, 2005; BARROS, KUNIGK e JURKIEWICZ, 2010; NAAS *et al.*, 2013). A nisina é uma proteína que apresenta atividade antimicrobiana, sendo denominada bacteriocina. Foi identificada pela primeira vez em alimentos em 1928 (MELO, SOARES e GONÇALVES, 2005).

A nisina é obtida por meio da fermentação da BAL em leite desnatado e é concentrada, separada, seca, moída e estabilizada com cloreto de sódio (75% do produto). Constitui um produto com período de vida útil de até 2 anos quando conservado nas condições ambientais adequadas (MORGAN *et al.*, 2001).

A nisina tem efeito sobre bactérias Gram-positivos (FRANCO e LANDGRAF, 2008), incluindo formadores de esporos, devido à adsorção de nisina sobre a membrana celular desses microrganismos sensíveis. Porém, demonstra pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativos, leveduras e fungos (BARROS, KUNIGK e JURKIEWICZ, 2010; NAAS *et al.*, 2013).

A nisina foi a primeira bacteriocina produzida por BAL com aplicações comerciais no processamento de alimentos e fermentações, reconhecida como segura, *Generally Recognized As Safe* (GRAS) (KLAENHAMMER, 1993). Sua aplicação em alimentos é permitida por ser uma substância estável ao calor, não tóxica e sensível às proteases digestivas (GUERRA *et al.*, 2005). Ela ainda não confere características sensoriais desagradáveis aos alimentos (odor e sabor), tem

estabilidade térmica durante o armazenamento e tem pequeno espectro antimicrobiano (JAY, 2005; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Entre as bacteriocinas, a nisina é a única utilizada como aditivo alimentar (INS 234) conservador que tem autorização para uso em alimentos pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (FRANCO e LANDGRAF, 2008) desde 1969. É utilizada em mais de 50 países, incluindo os Estados Unidos, China, União Europeia e Brasil (REUNANEN e SARIS, 2004; BARROS, KUNIGK e JURKIEWICZ, 2010).

No Brasil, a nisina é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), classificada pelo Compêndio da Legislação Brasileira de Aditivos Alimentares e indicada pelo Ministério da Saúde (MS) para uso em queijos no limite máximo de 12,5 mg/Kg de produto, segundo a Portaria DETEN/MS nº 29, de 22/01/1996 (BRASIL, 1996). O produto comercializado é dispensado de registro sanitário, conforme Resolução RDC nº 23, de 15/03/2000 e RDC nº 27, de 06/08/2010 (BRASIL, 2000a; BRASIL, 2010).

Além da estabilidade à alta temperatura e a ambientes ácidos, a nisina ainda suporta alta pressão. É uma bacteriocina que contém peptídeos, com resíduo de 34 aminoácidos e com o peso molecular de 3,5 kDa. Por causa da presença de resíduos de lanthionine e β -methyllanthionine, a nisina é classificada como um lantibiótico, ou seja, pertence à classe I das bacteriocinas (MELO, SOARES e GONÇALVES, 2005; BARROS, KUNIGK e JURKIEWICZ, 2010).

Como um lantibiótico, a nisina exerce um maior espectro de ação antimicrobiana, se comparada às demais classes de bacteriocinas, quando utilizada contra microrganismos Gram-positivos ou competindo com a microbiota. Ela também é bactericida contra células vegetativas (KLAENHAMMER, 1993).

A ação da nisina ocorre pelo bloqueio da força motriz de prótons e pelo desenvolvimento de poros nas membranas das células-alvo, com expulsão de solutos de baixo peso molecular, como aminoácidos, íons de potássio e nucleotídeos (GUERRA *et al.*, 2005; GADANG *et al.*, 2008; NAAS *et al.*, 2013).

Para Barros, Kunigk e Jurkiewicz (2010), a nisina mostrou-se efetiva em controlar microrganismos deteriorantes e patogênicos em diversos produtos cárneos. Entretanto, essa atividade antagonista pode ser afetada por fatores como a concentração, microrganismo-alvo, interação com outros componentes do alimento,

conteúdo lipídico e tipo de fosfato, processamento e condições de estocagem do alimento.

Em produtos cozidos, embalados a vácuo, e em produtos cárneos refrigerados, como é o caso de salsichas, a nisina pode ser aplicada para inibir a deterioração causada por bactérias lácticas resistentes à baixa temperatura de armazenamento, presença de nitrito e sal de cura e ambiente com baixa concentração de oxigênio (BARROS, KUNIGK e JURKIEWICZ, 2010).

No Brasil, segundo a legislação, a nisina é permitida para aplicação utilizando as técnicas de imersão e aspersão na superfície de salsichas ao final do processo térmico (BRASIL, 1998). A recomendação do fabricante é a aplicação de uma solução de 200mg/L de Nisaplin® (*Beamminster, Dorset, United Kingdom*), que pode ser dissolvido em solução de ácido fosfórico.

A nisina também foi aplicada na preservação de peixes e mariscos em um estudo realizado por Neetoo *et al.* (2008), que avaliaram o uso de uma película de plástico revestida com nisina para inibir o crescimento de *L. monocytogenes* em salmão defumado armazenado sob refrigeração. O efeito bacteriostático foi pronunciado à temperatura de refrigeração, e o estudo apontou ser vantajoso o uso de nisina no controle do patógeno.

Hampikyan e Ungur (2007) avaliaram o uso de diferentes concentrações de nisina: 0, 5, 10, 25, 50 e 100µg/g em produto cárneo fermentado previamente contaminado por 10⁶ UFC/g de *L. monocytogenes*. Após 25 dias, não foi detectada a sobrevivência de *L. monocytogenes* nos produtos adicionados de nisina com concentração de 50 e 100 µg/g de produto. Assim, com o aumento da concentração de nisina, ocorreu maior inibição do patógeno.

Em um estudo avaliando o efeito do óleo essencial de orégano e nisina no controle de *L. monocytogenes* Scott A em linguiça frescal refrigerada, Kruger (2006) relatou que a concentração de 0,5% (v/v) de óleo de orégano isoladamente nas formulações estudadas não afetou a multiplicação de *Listeria monocytogenes*. No entanto, quando adicionada de 200 ppm de nisina, ocorreu a redução de 2 ciclos logarítmicos na contagem de *L. monocytogenes* em todas as formulações.

Barros, Kunigk e Jurkiewicz (2010) avaliaram a eficiência da utilização de nisina em tripa natural de salsichas para o controle de microrganismos deteriorantes. Foram avaliados três fatores: o diluente utilizado na hidratação da tripa (ácido

fosfórico 0,1% ou água), presença de nisina 200ppm e a temperatura de armazenamento (4 e 10°C). Os resultados demonstraram que o efeito inibitório sobre os microrganismos deteriorantes é potencializado quando a nisina está na presença de ácido e em baixas temperaturas.

Segundo Klaenhammer (1993), existem três consideráveis fenótipos de nisina que podem conferir resistência a bactérias Gram-positivos: Nisina imunidade (Imm⁺), Nis^r e Nis^m. A primeira exerce maior nível de resistência; a segunda é uma classe de nisina resistente em que um gene não está ligado de modo genético à produção de nisina; e a terceira é uma mutação nisina-resistente pelo aparecimento de mutantes espontâneos.

Nisinas resistente e mutante ocorrem em populações mais sensíveis a elas, como as bactérias Gram-positivos expostas a altas concentrações de nisina, quando esta é utilizada como conservante. Nis^m tem sido descrita em *Lactococcus*, *Listeria* e *Leuconostoc* (KLAENHAMMER, 1993).

3.3 Salsicha

Segundo o ICMSF (2002), há milhares de anos, civilizações primitivas descobriram processos para a preservação da carne, como a salga, secagem pelo sol e o cozimento, sendo o embutido uma das formas mais antigas de alimentos processados.

A origem do termo “sausage” (embutido) vem da palavra latina *salus*, que significa carne picada ou triturada preservada por salga. A elaboração da salsicha ocorreu em 1487, na cidade de Frankfurt-am-Main, na Alemanha, considerada possivelmente a terra natal do cachorro-quente (ICMSF, 2002).

O Brasil é o 3º maior produtor e o 4º maior exportador mundial de carne suína, num total de 3,49 milhões de toneladas produzidas (ABIPECS, 2013). Além disso, 65% da carne utilizada no mercado interno são vendidos sob a forma de embutidos, e 12% do total da carne, sob a forma de salsicha (ABIPECS, 2010).

Segundo a Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000, que estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Salsicha, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000b), a salsicha é classificada como um produto cozido e definida como “produto cárneo

industrializado, obtido da emulsão de carne de uma ou mais espécies de animais de açougue, adicionado de ingredientes, embutido de envoltório natural, artificial ou por processo de extrusão e submetido a um processo térmico adequado”. A salsicha pode, ainda, passar por processos alternativos, como tingimento, depelação, defumação e utilização de recheios e molhos.

Como ingredientes, a salsicha pode conter carnes de diferentes espécies de animais de açougue, carnes mecanicamente separadas até o limite de 60%, miúdos comestíveis de diferentes espécies de açougue, como estômago, rins, coração, língua, miolos e fígado, e ainda tendões, pele e gorduras (BRASIL, 2000b). São adicionados também água, sal e condimentos. Após o processo térmico, a salsicha adquire a consistência sólida. Este tipo de produto é considerado uma emulsão, onde a fase dispersa é formada por pequenos glóbulos e é composta por partículas de gordura líquida ou sólida, enquanto a fase contínua é constituída de água, sal e proteínas em suspensão (CAMPOS *et al.*, 2014).

Embutidos cozidos, em especial a salsicha, são bastante consumidos no mundo todo. Nos EUA, estima-se o consumo aproximado de 20 bilhões de salsichas por ano, ou seja, cerca de 60 salsichas/pessoa/ano (ICMSF, 2002). No Brasil, com o aumento do poder aquisitivo da população, ampliou-se o consumo de carnes, e a salsicha é o produto cárneo que mais se destaca nas vendas (INMETRO, 1998). Segundo Botsaris e Taki (2014), as salsichas contribuem para a alimentação no mundo inteiro, principalmente devido à sua aceitação em todas as camadas da população. Esse produto é bastante utilizado por ser popular, barato e comumente consumido por pessoas jovens e em restaurantes *fast-food*.

Microrganismos deteriorantes limitam a vida útil de salsichas, e a manipulação pode contaminar os produtos por meio de microrganismos patogênicos. Salsichas comercializadas a vácuo possuem validade de até 55 dias armazenadas em temperatura de 2°C, ou 29 dias em temperatura de 8°C. Diversos métodos de preservação são utilizados em salsichas, como adição de conservantes artificiais, naturais, irradiação, alta pressão, técnicas de defumação e salga (BOTSARIS e TAKI, 2014).

Os padrões microbiológicos para alimentos, incluindo a salsicha, são regulamentados por meio da Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2001). No Quadro 2, estão os

microrganismos e o limite de contagem permitido pela legislação brasileira para salsicha.

Quadro 2 - Padrão microbiológico para salsicha

Microrganismo	Tolerância (UFC. g ⁻¹)
Coliformes a 45°C	10 ³
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	3 x 10 ³
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência/25g
<i>Clostridium</i> sulfito redutor a 46°C	5 x 10 ²

Fonte: BRASIL, 2001.

3.4 *Listeria*

O gênero *Listeria* é compreendido por bastonetes Gram-positivos, não esporulados, catalase-positivos, que não coram pela ação do ácido rápido. Além disso, produzem ácido láctico a partir de glicose e outros açúcares fermentados. *Listeria* spp. tem parede celular essencialmente composta por peptidoglicanos, ácidos teicoicos e lipoteicoicos, e suas colônias, quando observadas à iluminação normal, apresentam, no ágar, uma tonalidade cinzenta e, ao microscópio binocular com luz incidente oblíqua (iluminação de Henry), uma coloração verde-azulada característica (JAY, 2005).

Essa bactéria tem sua classificação taxonômica pertencente ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Bacillales*, família *Listeriaceae*, gênero *Listeria*, e é constituída de diversas espécies e subespécies (GARRITY *et al.*, 2007).

A *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* é uma lista atualizada que contém a nomenclatura e a taxonomia do reino procarionte, organizada pelo pesquisador J. P. Euzéby, e é continuamente reformulada. Atualmente, cita 19 espécies e 6 subespécies de *Listeria* spp.; porém, oficialmente, são 15 espécies e 6 subespécies reconhecidas (EUZÉBY, 2015).

O gênero *Listeria* compreende as espécies e subespécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* (FRANCO e LANDGRAF, 2008). No entanto, recentemente foram descobertas e introduzidas novas espécies e

subespécies, sendo a maioria isolada do ambiente natural, como fazendas, agricultura, lagos e tanques de água, e somente uma isolada de queijo: *L. marthii* sp. nov. (GRAVES *et al.*, 2010), *L. rocourtiae* sp. nov. (LECLERCQ *et al.*, 2010), *L. weihenstephanensis* sp. nov. (LANG HALTER, NEUHAUS e SCHERER, 2013), *L. fleischmannii* sp. nov. (BERTSCH *et al.*, 2013), *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* sp. nov. e *L. fleischmannii* subsp. *fleischmannii* sp. nov. (DEN BAKKER *et al.*, 2013), *L. aquática* sp. nov., *L. cornellensis* sp. nov., *L. floridensis* sp. nov., *L. grandensis* sp. nov., e *L. riparia* sp. nov. (DEN BAKKER *et al.*, 2014).

O gênero *Listeria* é ubiqüitário, podendo ser encontrado naturalmente e sobreviver em diversos ambientes, como solo, água, plantas e derivados, mas também em vegetação deteriorada, fezes de animais, silagens, esgotos, trato gastrointestinal, manipuladores de alimentos, animais e suas rações. Sua temperatura de crescimento pode variar de 1°C até 45°C, e o pH de 4,1 a 9,6. Além disso, cresce em valores de atividade de água abaixo de 0,93 (JAY, 2005).

Listeria é classificada como um microrganismo patogênico, pois representa um risco à saúde de seres humanos e animais e pode contaminar o alimento sob diversas formas (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Essa bactéria pode ser encontrada em alimentos crus e/ou processados que são contaminados durante ou após o seu processamento (EFSA, 2013).

As espécies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* contêm genes patogênicos que desempenham o principal fator de virulência do gênero *Listeria*. A primeira é patogênica para os seres humanos e animais, e a segunda, para animais, em especial ruminantes (LINKE *et al.*, 2014).

As espécies de *Listeria* são caracterizadas por seus antígenos, que determinam 17 sorovares, sendo que a *L. monocytogenes* é a principal espécie patogênica, com 13 sorovares. As mais frequentemente isoladas são do tipo 1 e 4 (JAY, 2005). *L. monocytogenes* é quase exclusivamente responsável pelos casos de listeriose (EFSA, 2013).

3.4.1 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes apresenta-se sob a forma de um bastonete, Gram-positivo, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, catalase positivo e oxidase

negativo (ICMSF, 2002; JAY, 2005; FRANCO e LANDGRAF, 2008) e fermenta a glicose e outros carboidratos (SILVA *et al.*, 2007).

L. monocytogenes está amplamente distribuída na natureza - no solo, na água (reservatórios primários) e também em vegetação, plantas em decomposição, silagem (SILVA *et al.*, 2007), esgoto, fezes humanas e animais, resíduos de abatedouro e em leite de vacas saudáveis e de infectadas com mastite (ICMSF, 2002). Pode ser isolada de diferentes alimentos, incluindo carnes e produtos cárneos. Nestas indústrias, pode estar nos maquinários e vir a contaminar produtos pasteurizados durante o seu corte e embalagem (ABEE, KROCKEL e HILL, 1995). Além dos produtos cárneos, também é encontrada em alimentos lácteos e vegetais, como em carnes frescas e congeladas, frango, frutos do mar, leite cru, queijo mole, frutas e produtos vegetais diversos (JAY, 2005).

L. monocytogenes move-se por meio de flagelos peritríquios, por movimentos de tombamento característico, auxiliando sua identificação (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Esses flagelos são móveis a 35°C, mas a motilidade característica ocorre com crescimento a 25°C, por meio de movimento rotatório e de tombamento já mencionado. Em meios de cultura semissólidos para avaliar a motilidade, como o Ágar Indol Sulfeto Motilidade (SIM), percebe-se crescimento numa zona típica com produção de massa característica observada por espalhamento na superfície, mantendo-se restrita à picada no fundo do tubo de ensaio, assemelhando-se a um guarda-chuva (SILVA *et al.*, 2007).

Em suas pesquisas, alguns autores concordam e outros divergem quanto à temperatura e o pH de crescimento deste patógeno. Para o ICMSF (2002), a faixa de temperatura é bastante ampla, entre 0,4 e 45°C, e o pH, de 4,39 a 9,4. Jay (2005) afirma que a temperatura de crescimento de *L. monocytogenes* fica entre 1°C e 45°C e que o pH mínimo encontrado para o seu crescimento em alimentos é de 4,1, podendo chegar ao máximo de 9,6. SILVA *et al.* (2007) confirmam os resultados de temperatura, entre 1 e 45°C, com a temperatura ótima de 30 a 37°C. Porém, Franco e Landgraf (2008) asseguram que o crescimento ocorre entre 2,5°C e 44°C, havendo possibilidade de crescimento a 0°C. Quanto ao pH, é ótimo entre 6,0 e 8,0, mas também cresce entre 5,0 e 9,0 e, em meios de cultura, chega até a 9,5.

Esse crescimento de *L. monocytogenes* em ampla faixa de temperatura justifica a sua sobrevivência em alimentos por longos períodos de tempo (JAY,

2005), suportando sucessivos congelamentos e descongelamentos (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Constitui, portanto, um risco para os produtos prontos para o consumo, como os produtos cárneos cozidos (EFSA, 2013).

Para o ICMSF (2002), quanto à concentração salina, o crescimento de *L. monocytogenes* ocorre em níveis $\leq 10\%$. Para Franco e Landgraf (2008), a concentração de NaCl é muito dependente da temperatura do meio para sua sobrevivência, sendo que, a 37°C em 10,5% NaCl, sobrevive por 15 dias. Porém, sob 20% a 30% NaCl, na mesma temperatura, sobrevive por 5 dias, por exemplo. A atividade de água ótima é de 0,97, podendo se multiplicar em faixas consideradas baixas para patógenos, como a 0,92. *L. monocytogenes* sobrevive aos níveis recomendados pelas indústrias de carnes quanto ao nitrato de sódio (120 mg/Kg) e cloreto de sódio (3%), constituindo sérios problemas, neste caso.

Segundo Liu *et al.* (2002), por sobreviver a baixas temperaturas, *L. monocytogenes* é considerado um microrganismo psicrotolerante. Esse mecanismo tem sido bastante estudado, e evidências mostram que as temperaturas reduzidas produzem resultados sobre o crescimento das bactérias, como alterações na síntese de proteínas, influências no ribossomo, na membrana citoplasmática e na absorção de solutos.

Como reação à redução da temperatura, há um incremento da expressão das proteínas bacterianas ao choque térmico como uma espécie de aclimação, ao contrário de uma resposta de adaptação em longo prazo. Além disso, vários solutos de baixo peso molecular da membrana atuam como agentes crioprotetores, estimulando o crescimento de *L. monocytogenes* (LIU *et al.*, 2002).

3.4.2 Listeriose

Surtos de listeriose ocorreram com muita frequência na década de 80, vinculados ao consumo de alimentos contaminados, como salada de repolho tipo *coleslaw* (Canadá), leite pasteurizado (EUA, 1983), queijo mole tipo mexicano (EUA, 1985 e Suíça, 1983-1987). *Listeria* pode contaminar vários alimentos, desde crus, produtos termoprocessados e até refeições prontas para o consumo (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A listeriose é grave em humanos e compromete principalmente o

desenvolvimento de fetos (com risco de aborto em grávidas), recém-nascidos, pessoas imunocomprometidas (EFSA/ECDC, 2014), com cirrose, carcinoma ou outra doença que comprometa o sistema imunológico (FRANCO e LANDGRAF, 2008), e idosos, correspondendo ao total de 15 a 20% da população (ICMSF, 2002).

A sintomatologia da listeriose é diversificada, pois depende do estágio em que se encontra no organismo humano, podendo se assemelhar a uma gripe, acompanhada de diarreia e febre (fase entérica). Há relatos de fadiga, mal-estar, náuseas, vômitos e dores (bacteremia). A listeriose pode ainda ocasionar meningite, encefalite e abscessos (comprometimento do SNC), além de endocardite e osteomielite (formas raras) (FRANCO e LANDGRAF, 2008). As infecções com risco fatal são caracterizadas por septicemia e meningoencefalite, e, apesar de serem raras em humanos, ainda recebem muita atenção devido à gravidade da doença, com altas taxas de internação, e constitui a principal causa de mortalidade associada ao microrganismo em países industrializados (EFSA/ECDC, 2014).

Casos de listeriose possuem alta taxa de letalidade, cerca de 17,8% entre 112 casos confirmados em 2012 na União Europeia (EFSA/ECDC, 2014), e causam cerca de 1.500 hospitalizações e 260 mortes por ano nos EUA (USDA FSIS, 2015), numa estimativa global superior a 23.000 hospitalizações e 5.000 mortes, em 2010 (NOORDHOUT *et al.*, 2014).

Apesar da listeriose não ocorrer com tanta frequência, são estimados de 2 a 6 casos por milhão de pessoas, sendo 20 a 30% fatais. 13 sorotipos de *L. monocytogenes* são identificados, mas somente 3 são associados à doença: 4b, 1/2a e 1/2b (ICMSF, 2002).

L. monocytogenes é um patógeno intracelular, onde as linhagens virulentas produzem uma substância extracelular conhecida por listeriolisina (LLO), uma hemolisina. Ela é responsável pela difusão do microrganismo de célula para célula quando da invasão do epitélio intestinal - que é o mecanismo que separa espécies de *Listeria* não patogênicas, apesar de que linhagens virulentas contêm também outras substâncias (JAY, 2005).

O sorovar 1/2a é mais comumente encontrado isolado de alimentos, e o 4b, que possui propriedades de virulência maiores que os demais, nos casos envolvendo surtos em humanos. O fator de virulência mais relevante associado é a listeriolisina O (JAY, 2005). A dose mínima infecciosa é desconhecida e diverge

conforme a cepa e a suscetibilidade do indivíduo atingido (ICMSF, 2002; SILVA *et al.*, 2007).

Um surto de listeriose humana envolvendo o sorovar 4b de *L. monocytogenes* em leite pasteurizado ocorreu em 1983, em Massachussetts. Esta linhagem ficou conhecida como Scott A (JAY, 2005).

Um dos casos registrados de grande repercussão envolvendo o consumo de salsicha e outros produtos cárneos contaminados com *L. monocytogenes* ocorreu entre 1998 e 1999, ocasionando o *recall* destes produtos e a morte de 21 pessoas em vários estados dos EUA (USDA FSIS, 2015).

No estudo realizado por Destro, Melo Serrano e Kabuki (1991), no Brasil, cerca de 70% das amostras de salsicha analisadas estavam contaminadas por *L. monocytogenes*. Em outro estudo semelhante, Pettinati, Telle e Ballian (2006) encontraram 25,6% das amostras de salsicha confirmadas para *Listeria* spp, e, destas, 55,4% foram positivas para *L. monocytogenes*.

3.4.3 *Listeria monocytogenes* em alimentos

Os surtos de origem alimentar vêm sendo associados à ingestão de produtos com vida útil longa e prontos para o consumo, *ready-to-eat*. *L. monocytogenes* tem a capacidade de sobreviver e multiplicar em alimentos contaminados refrigerados durante o seu período de estocagem, sendo considerada como potencial veículo de infecções de origem alimentar (GADANG *et al.*, 2008).

Estima-se que 20% dos casos esporádicos causados por *L. monocytogenes* estão ligados ao consumo imediato de pelo menos dois produtos alimentícios contaminados pelo patógeno. Além disso, se associados à proporção de consumo de salsichas, devem estar em um alto nível de contaminação ($\geq 10^3$ UFC. g⁻¹) (ICMSF, 2002).

O longo período de vida útil, sob refrigeração, dos produtos cárneos prontos para o consumo favorece o crescimento de *L. monocytogenes*, por meio de contaminação cruzada durante o seu processamento. O consumo desses produtos sem um tratamento adicional favorece a transmissão de doenças. A frequência de surtos envolvendo o patógeno requer intervenções estratégicas para garantir a inocuidade dos produtos (THEIVENDRAN, HETTIARACHCHY e JOHNSON, 2006).

Além disso, é comum, no momento do preparo e consumo, não ser utilizado nenhum cozimento ou o produto ser apenas requeitado, constituindo um sério risco para a saúde (ICMSF, 2002).

Segundo Jay (2005), para o comportamento de *L. monocytogenes* em carnes embaladas a vácuo, foi elucidado que os fatores críticos para o seu desenvolvimento são a temperatura de estocagem, pH e o percentual de gordura. É relatado que há o crescimento do patógeno mesmo em temperaturas e pH mais elevados, como até 45°C, embora a temperatura ótima seja entre os 30°C e 37°C, e valores de pH de até 9, embora o pH ótimo de multiplicação seja 7; e também em carnes com maior porcentagem de gordura, que parece exercer um efeito protetor. Mesmo na condição de conservação sob vácuo, há crescimento do patógeno, principalmente pela possibilidade de seu desenvolvimento em temperaturas de refrigeração.

A regulamentação sobre *L. monocytogenes* em alimentos é variável para cada país, divergindo em vários aspectos sobre limite máximo permitido (Quadro 3). Alguns países estabelecem limites, em especial para produtos prontos para o consumo. Outros sugerem critérios; porém, sem base legal (JAY, 2005).

Quadro 3 - Regulamentação sobre limite máximo permitido de *L. monocytogenes* em alimentos para alguns países

País	Regulamentação	Critério
EUA (1995)	Ausência em 50 g de amostras	Considerado adulterante
EC (1995)	Ausência em 25 g de amostras para leite e derivados (queijos moles) Ausência em 1 g de amostra para demais produtos	Tolerância zero para lácteos
Grã-Bretanha (1995)	1) Não detectado em 25 g = satisfatório 2) 10^2 em 25 g = razoavelmente satisfatório 3) 10^2 a 10^3 = insatisfatório 4) $> 10^3$ = produto inaceitável	Produtos prontos para o consumo

Cont. Quadro 3 - Regulamentação sobre limite máximo permitido de *L. monocytogenes* em alimentos para alguns países

Canadá (1993)	<p>Categoria 1: produtos relacionados com surtos; Categoria 2: alimentos com vida útil > 10 dias; Categoria 3: alimentos em que há possibilidade de desenvolvimento do patógeno com uma vida útil ≤ 10 dias e alimentos em que não há possibilidade de desenvolvimento do patógeno.</p>	<p>Produtos prontos para o consumo <i>Recall</i> de alimentos da categoria 3 requerem > 10²/g</p>
Alemanha (1995)	<p>Classificação em 4 níveis de risco (semelhante ao Canadá); Produtos com > 10⁴/g sujeitos a <i>recall</i> imediato.</p>	<p>Tolerância zero (ausência em 25 g) é irreal e desnecessária</p>
Austrália (1995)	<p>Ausência em 5 amostras de 25 g de muitos queijos</p>	
França (1995)	<p>Ausência em amostras de 25 g de alimentos para indivíduos em risco; Ausência em alimentos crus.</p>	
ICMSF	<p>Até 10²/g alimento é considerado aceitável para indivíduos saudáveis; Apoia o uso de ferramentas do Controle de Qualidade: APPCC; Há severidade quando o perigo a que o alimento está submetido é moderado, direto, com espalhamento potencialmente extensivo.</p>	<p>Comissão Internacional em Especificações Microbiológicas para Alimentos</p>

Fonte: adaptado de JAY, 2005.

Apesar de *L. monocytogenes* não ser declarada nos padrões microbiológicos específicos para salsicha na legislação brasileira, a RDC nº 12/2001 estabelece que, para alimentos em geral, o limite permitido é ausência em 25 g para *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.* e outros patógenos (BRASIL, 2001).

Em uma pesquisa realizada pela União Europeia e pela Noruega para avaliar a existência de *L. monocytogenes* em amostras de produtos prontos para o consumo, especificamente produtos cárneos embalados (produtos cozidos refrigerados, embutidos e patês) e peixes e queijos adquiridos nos mercados locais, detectou-se a prevalência de 2,07% das amostras contaminadas por *L. monocytogenes*. Destas, a maioria (99,1%) obteve contagens abaixo de 10 UFC.g⁻¹ produto. No entanto, foram encontrados produtos com contagens de até 10² UFC.g⁻¹ (0,43%), e 3 amostras do total alcançaram níveis de 10³ UFC.g⁻¹ do produto (EFSA, 2013).

Para o ICMSF (2002), é importante reconhecer que, utilizando as tecnologias atuais, não é possível eliminar a contaminação dos alimentos por *L. monocytogenes*. Mas há medidas de controle que podem ser utilizadas na indústria de alimentos, como na produção de salsichas, a fim de evitar a contaminação e/ou controlar para que a concentração do patógeno no alimento não exceda 10² UFC. g⁻¹. As ferramentas do controle de qualidade mais utilizadas são BPF e APPCC. Algumas combinações de medidas podem ser:

- a) controle dos níveis iniciais na matéria-prima;
- b) prevenção da recontaminação entre as etapas de pasteurização e embalagem;
- c) pasteurização do produto embalado;
- d) prevenção do aumento dos níveis na etapa de estocagem;
- e) redução dos níveis antes do consumo.

Muitos autores têm pesquisado a inibição de *L. monocytogenes* em carnes e produtos cárneos utilizando diversos mecanismos e combinações de substâncias, tais como filmes de isolado proteico de soro de leite com nisina, extrato de semente de uva, ácido málico e EDTA em salsichas de peru (GADANG *et al.*, 2008); filmes de proteína de soja contendo nisina com extrato de semente de uva e extrato de chá verde em salsichas de peru (THEIVENDRAN, HETTIARACHCHY e JOHNSON, 2006); utilização de orégano e cranberry em carne e peixe (LIN, LABBE e SHETTY, 2004); filmes comestíveis contendo nisina e isolados proteicos de soro e soja, clara de ovo e glúten de trigo (KO *et al.*, 2001).

Além disso, BAL estão sendo introduzidas em produtos cárneos prontos para o consumo refrigerados como cultura de proteção aplicadas como alternativa

de técnicas de biopreservação. Outro uso é de bacteriocinas anti-listeriais purificadas adicionadas diretamente sobre o produto como forma de aditivo natural (ABEE, KROCKEL E HILL, 1995).

A biopreservação é interessante por desenvolver uma condição desfavorável ao desenvolvimento de microrganismos patogênicos e, ao mesmo tempo em que garante a inocuidade, preserva as características sensoriais e nutricionais com a possibilidade de redução de aditivos químicos no produto (VAZ-VELHO *et al.*, 2013).

Para Lücke (2000), em função dos efeitos limitados das culturas de proteção, estas não podem compensar deficiências no controle dos processos de fabricação dos produtos.

A segurança e inocuidade das carnes e produtos cárneos são atributos de interesse tanto da indústria quanto dos consumidores. Assim, é muito importante uma abordagem clara sobre a cadeia alimentar dos produtos “do campo à mesa”. Ressalta-se que a data de validade e a preferência por alimentos frescos são fatores importantes no poder decisório de compra. Os consumidores ainda optam por alimentos leves, com baixo teor de gordura e naturais, isentos de conservantes (LÜCKE, 2000).

3.4.3.1 *Listeria monocytogenes* em salsicha

Segundo o ICMSF (2002), *L. monocytogenes* são encontradas com frequência em alimentos prontos para o consumo, numa proporção entre 10^2 e 10^9 UFC. g^{-1} . A recomendação é que a concentração de *L. monocytogenes* em salsichas não deve exceder 10^2 UFC. g^{-1} no tempo de consumo.

A etapa de cozimento das salsichas elimina os microrganismos patogênicos, como *L. monocytogenes*. No entanto, podem ocorrer contaminações após esta etapa e, em casos raros, levar à doença. O patógeno é eliminado na etapa do processo de cozimento ou pasteurização da salsicha, com temperaturas $\geq 70^\circ\text{C}$. Entretanto, entre esta etapa e a embalagem, no ambiente de processamento, o embutido cozido pode ser recontaminado. E, devido ao longo período de estocagem, os microrganismos patogênicos podem se multiplicar em níveis perigosos na superfície da salsicha ou no próprio exsudato. Este, em especial,

contém maior número de células do patógeno e é uma fonte potencial de contaminação cruzada na cozinha (ICMSF, 2002).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por causa da preocupação com a situação dos alimentos quanto à contaminação por *L. monocytogenes*, instituiu a Instrução Normativa nº 09, de 08 de abril de 2009, sobre os procedimentos de controle de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo (BRASIL, 2009).

O objetivo desta IN é “monitorar e assegurar a inocuidade destes produtos em relação a este patógeno, e aplicam-se aos estabelecimentos que fabricam produtos de origem animal prontos para o consumo que apresentem as seguintes características físico-químicas: pH > 4.4 ou Atividade de Água > 0.92 ou concentração de cloreto de sódio < 10 % respeitadas as características de seus processos de produção” (BRASIL, 2009).

Em sequência, o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Secretaria de Defesa Agropecuária (DIPOA/SDA) do MAPA publicou uma norma interna nº 01, de 09 de agosto de 2013, que aprovou os procedimentos operacionais complementares à Instrução Normativa nº 09, de 08/04/2009, definindo os procedimentos para a coleta oficial de amostras para o controle de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo a serem adotados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) (BRASIL, 2013).

Nesta norma interna, dentre outras providências, são listados os produtos que estão inclusos no programa, que são: produtos cárneos, lácteos e pescados. Dentre os produtos cárneos, estão o presunto cozido, presunto defumado, apresuntado, mortadela, fiambre, lanche, salsicha e salsichão, lombo cozido, lombo defumado, paleta cozida e paleta defumada (BRASIL, 2013).

Nos métodos oficiais para análises microbiológicas em alimentos de origem animal e água, do MAPA, é estabelecido o método analítico para a detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal, tendo a metodologia aplicada a todos os alimentos cárneos e lácteos. Os resultados devem ser expressos como presença ou ausência em 25 g ou mL. E sempre que as análises laboratoriais demonstrarem a presença de outras espécies de *Listeria*, no Certificado Oficial de Análise deverá constar: presença de *Listeria*, seguida do nome da espécie encontrada (BRASIL, 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Microbiologia de Alimentos (MICROAL), da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.1 Material

4.1.1 Cepas de bactérias lácticas

Foram utilizadas cepas de BAL isoladas de grãos de Kefir por Zanirati (2012), classificadas de acordo com os diferentes substratos (kefir de água ou kefir de leite), localidades (cidades) e identificadas por uma codificação alfanumérica.

No Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM), foram realizados o isolamento e a identificação preliminar morfológica das BAL por meio da coloração de Gram e teste de catalase. Estes isolados foram encaminhados ao Laboratório de Genética Molecular de Protozoários e Parasitas (LGMPP) para identificação molecular, ambos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB). Depois, alguns isolados foram encaminhados para sequenciamento do gene 16S do rRNA, no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), localizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia, todos da UFMG.

Para este estudo, foram excluídas as cepas que apresentaram crescimento ausente/lento e/ou contaminadas, sendo ao final utilizadas apenas 12 BAL que obtiveram melhor crescimento e atividade celular, sendo 6 cepas de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. perolens*, *L. mali*, *L. satsumensis*), 2 de *Lactococcus lactis* e 4 de *Leuconostoc mesenteroides* (Quadro 4).

4.1.2 Cepas de *Listeria monocytogenes*

Foram utilizadas quatro cepas de *L. monocytogenes* de diferentes sorotipos, envolvidas em surtos alimentares ou casos de listeriose (Quadro 5).

Quadro 4 – Cepas de bactérias lácticas isoladas do kefir utilizadas neste estudo

Espécie	Classificação*	Codificação
<i>Lactobacillus casei</i>	KABH	17U
<i>Lactobacillus perolens</i>	KASA	11P3
<i>Lactobacillus perolens</i>	KACU	17P2
<i>Lactobacillus mali</i>	KAVI	21U2
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	KACU	18P
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	KLSA	23P3
<i>Lactococcus lactis</i>	KLCU	3P
<i>Lactococcus lactis</i>	KASA	3R
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KLDI	9U2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KLVI	11U1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KLVI	13U2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KLVI	14U

* KABH - Kefir de água de Belo Horizonte; KASA - Kefir de água de Salvador; KACU - Kefir de água de Curitiba; KAVI - Kefir de água de Viçosa; KLSA - Kefir de leite de Salvador; KLCU - Kefir de leite de Curitiba; KLDI - Kefir de leite de Divinópolis. KLVI - Kefir de leite de Viçosa.

Fonte: ICB/UFMG - Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais (Minas Gerais, Brasil).

Quadro 5 – Cepas de *L. monocytogenes* utilizadas neste estudo

Código/ Número de identificação	Sorotipo	Temperatura de incubação *	Fonte**
Ausência de identificação	Cepa isolada de salsicha	30°C	FAT
ATCC® 19111™	1/2a	37°C	Fiocruz
ATCC® 19114™	4a	37°C	Fiocruz
ATCC® 19115™	4b	37°C	Fiocruz

* Temperatura recomendada pelas instituições fornecedoras das cepas.

** FAT: Fundação André Tosello (São Paulo, Brasil); Fiocruz: Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil).

4.1.3 Amostras de salsicha

As salsichas do tipo *hot dog* foram adquiridas em supermercados de Belo Horizonte, Minas Gerais (Brasil), em embalagens a vácuo, de 3 diferentes marcas (A, B e C), cada uma contendo 12 unidades de salsichas. Numa 1ª etapa (fase 1), utilizaram-se as diferentes marcas, onde se verificou o adequado crescimento e viabilidade das cepas de BAL selecionadas e de *Listeria monocytogenes*, com base na inoculação e recuperação dessas cepas nas amostras de salsichas.

As amostras de salsicha das marcas A, B e C foram inoculadas, igualmente, por cepas de BAL e *L. monocytogenes* e armazenadas sob refrigeração em B.O.D, ajustada e mantida a 10^o C. Após 7 dias de estocagem, foram realizadas análises de recuperação dos inóculos das cepas e contagem das colônias nas placas. Desse modo, definiu-se a marca que apresentou as melhores características de crescimento microbiano proporcional entre inoculação e recuperação para uso numa 2ª etapa (fase 2).

A metodologia utilizada para a inoculação, recuperação e contagem das colônias será descrita posteriormente.

4.1.4 Nisina comercial

A amostra de nisina, de nome comercial Nisaplin® (Beaminstor, Dorset, United Kingdom), foi gentilmente cedida pela empresa DuPont™Danisco®, através da Danisco Brasil LTDA (Cotia, São Paulo, Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Ativação das culturas lácticas

As culturas lácticas congeladas foram ativadas por meio da transferência de uma alíquota de 100 µL da cultura em 5 mL de caldo MRS (de Man, Rogosa, Sharpe - Difco®, Detroit, Michigan, EUA) e incubação a 37°C por 24 h para crescimento. Após, uma nova ativação foi realizada nas mesmas condições.

Após a segunda ativação, para verificação da pureza, as culturas lácticas

foram estriadas por esgotamento em placas de Petri contendo ágar MRS (Difco®, Detroit, Michigan, EUA), realizando-se, posteriormente, a coloração de Gram.

Para a manutenção das culturas puras em estoque, a partir da segunda ativação, alíquotas de 1500 µL foram transferidas para tubos criogênicos e microtubos e adicionadas de 20% glicerol. Os microtubos foram armazenados em freezer a -20°C para utilizações diárias, e os tubos criogênicos foram armazenados em ultrafreezer (Revco Scientific, Asheville, North Carolina, EUA), a -80°C, para utilizações futuras.

4.2.2 Ativação das cepas de *L. monocytogenes*

As culturas foram adquiridas em frascos de criopreservação contendo alíquotas de 1,0 mL de cultivo em meio semissólido ágar motility. Para a ativação das amostras, realizou-se a inoculação em caldo BHI (*Brain Heart Infusion* - Merck®, Darmstadt, Alemanha), por meio da transferência de 100 µL da cultura em 5 mL de caldo BHI cultivadas em aerobiose, incubadas de acordo com a temperatura adequada de cada cepa (Quadro 5), por 24 h. Em seguida, uma nova ativação foi realizada nas mesmas condições.

Para verificação da pureza das amostras, da morfologia das células e da confirmação de colônias típicas, foi realizada a coloração de Gram (Figura 2a), o cultivo em Ágar Indol Sulfeto Motilidade (SIM) (Merck®, Darmstadt, Alemanha), incubação a 30°C/24-48 h e observação do crescimento assemelhando-se a um guarda-chuva ou chapéu chinês (Figura 2b) (SILVA *et al.*, 2007).

Para a manutenção das culturas puras, elas foram cultivadas em tubos contendo caldo BHI (Merck®, Darmstadt, Alemanha), incubadas em suas respectivas temperaturas por 24 horas. Para a conservação de algumas cepas, uma alíquota de 1500 µL foi transferida para microtubos, adicionada de 20% glicerol e armazenada em freezer a -20°C, para estoque. Outras amostras foram estocadas sob refrigeração, a 4°C, para utilizações diárias.

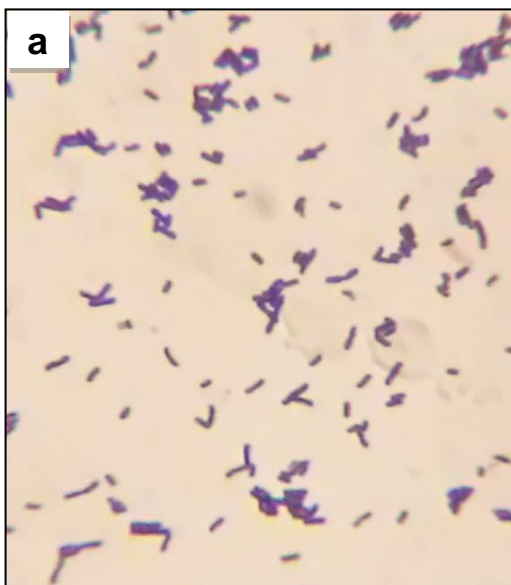


Figura 2a – Coloração de Gram de *L. monocytogenes* 4b



Figura 2b - Teste de motilidade

4.2.3 Preparo da nisina comercial

Nisaplin® (Beaminster, Dorset, United Kingdom) é o nome comercial de um produto que contém 2,5% de nisina, com atividade mínima de 1000 UI de nisina por mg de produto. A recomendação do fabricante para sua utilização é de 25-500 mg de Nisaplin® por Kg ou L de produto, dependendo da natureza do produto para o uso pretendido.

O MAPA (BRASIL, 1998), por meio de uma Autorização de Uso de Produto - AUP 563/98, permite o emprego, nas superfícies externas de produtos cárneos, mais especificamente nas salsichas dos diferentes tipos, de uma solução de 200 ppm (0,02%) de Nisaplin®. Desse modo, foi preparada uma solução de 200 mg de Nisaplin® (200 mg em 1L), mantida em repouso por duas horas à temperatura de refrigeração. Em seguida, foi filtrada utilizando-se uma membrana de poros de 0,22 µm (Millex®, Inglaterra), cuja solução foi armazenada sob refrigeração até sua utilização.

4.2.4 Análises *in vitro*

4.2.4.1 Testes de antagonismo

Neste ensaio, dentre 12 cepas de BAL disponíveis, foi feita a seleção das que apresentaram a melhor atividade antagonista frente às 4 cepas de *L. monocytogenes*, com base na observação das maiores médias de halos e os menores coeficientes de variação por inibição direta pelo método *Spot-on-the-lawn*. Assim, foram selecionadas 4 cepas de BAL que, pelo mesmo método, foram confrontadas com as 4 cepas de *L. monocytogenes*.

Em seguida, foram realizados testes de inibição indireta pelo método Difusão em poços, confrontando as 4 cepas de BAL selecionadas contra as 4 cepas de *L. monocytogenes*, tendo como critério de seleção as maiores médias de halos.

Baseando-se nos resultados de análises estatísticas, foram selecionadas a cepa de BAL com maior atividade antagonista e também a cepa de *L. monocytogenes* que apresentou a maior sensibilidade. Todas as análises foram realizadas em duplicata com seis repetições.

4.2.4.1.1 Teste de atividade inibitória direta - *Spot-on-the-lawn*

A análise do teste de atividade inibitória direta por método *Spot-on-the-lawn*, adaptado de Oliveira (2008), baseou-se no cultivo por picada em ágar MRS das quatro cepas de bactérias lácticas selecionadas com o auxílio de palito estéril e posterior incubação a 37°C, por 24-48 h. Após esse período de crescimento das colônias das BAL (cultura produtora), as placas foram colocadas invertidas, e foi introduzido 1 mL de clorofórmio nas tampas. Aguardou-se um tempo aproximado de 30 minutos para a inativação das culturas e permanência apenas dos metabólitos produzidos e difundidos no ágar.

Em continuidade do teste, para a sobrecamada, foram utilizadas quatro cepas reveladoras de *L. monocytogenes*, que foram previamente cultivadas em caldo BHI (Merck®, Darmstadt, Alemanha) (100 µL em 5 mL) e incubadas nas temperaturas conforme indicado no Quadro 5, por 17 h ± 1h. Na preparação da sobrecamada, inoculou-se 10 µL deste repique para cada 100 mL de ágar

semissólido BHI 0,9%.

Em capela de fluxo laminar, as colônias de BAL cultivadas em ágar MRS foram inicialmente seladas com o ágar BHI 0,9% estéril e, logo em seguida, adicionou-se uma sobrecamada de 15 mL de meio semissólido de cada cultura reveladora de *L. monocytogenes*. Após a solidificação, a placa foi incubada por 48 h, para posterior leitura e interpretação dos resultados. Em outra placa estéril, foi vertido 15 mL do meio de sobrecamada para o controle de crescimento das cepas de *L. monocytogenes*.

A leitura foi realizada com o auxílio de um paquímetro, medindo-se o diâmetro dos halos formados em torno das culturas, que consta de uma zona mais clara em torno delas, indicando a inibição pelas cepas de *L. monocytogenes*.

4.2.4.1.2 Obtenção de sobrenadante livre de células

A obtenção dos sobrenadantes livres de células, adaptado de Cintas *et al.* (1995), teve como objetivo a separação dos metabólitos antimicrobianos produzidos pelas BAL selecionadas de suas células, permitindo, assim, avaliar seus efeitos isoladamente. Para isso, as cepas de BAL que apresentaram atividade inibitória direta foram novamente cultivadas em 30 mL de caldo MRS, incubadas a 37°C, por 24 horas. Após incubação, o cultivo foi centrifugado a 5.000g durante 10 minutos, a 4°C, em centrífuga refrigerada (modelo Sigma 2K15), e o sobrenadante obtido foi separado do precipitado. Este sobrenadante foi utilizado no teste de atividade inibitória indireta.

Em testes preliminares, uma parte do sobrenadante obtido teve o pH ajustado para valores de 6,2 com NaOH 10M, 5M e 1M para eliminar a possibilidade de que a inibição observada fosse causada por substâncias inibitórias, como ácidos orgânicos. Esse sobrenadante neutralizado foi separado em duas alíquotas, sendo uma denominada de sobrenadante neutralizado (SN), e a outra foi filtrada em membranas de poros de 0,22 µm, obtendo-se o sobrenadante neutralizado e filtrado (SNF).

4.2.4.1.3 Teste de atividade inibitória indireta – Difusão em poços

A análise do teste de atividade inibitória indireta pelo método Difusão em poços, adaptado de Cintas *et al.* (1995), baseou-se na atividade antimicrobiana dos sobrenadantes livres de células contra as cepas de *L. monocytogenes*.

As placas de Petri contendo ágar BHI 0,9%, previamente inoculadas com as quatro cepas bacterianas de *L. monocytogenes* (10 µL para 100 mL de meio), permaneceram sob refrigeração por um período aproximado de 1 h para melhor solidificação do meio. Após essa etapa, utilizando um vazador de aço inox estéril, foram feitos poços de 6 mm de diâmetro que foram preenchidos com 50 µL dos sobrenadantes, sendo que um dos poços foi preenchido com 50 µL de Nisaplin® 200 ppm, aplicado para controle e como parâmetro de comparação para a atividade apresentada pelos demais sobrenadantes livres de células.

As placas foram mantidas sob refrigeração por duas horas para difusão dos sobrenadantes no ágar, sendo incubadas conforme as temperaturas apresentadas no Quadro 5, por 24 h. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos poços, que consta de uma zona mais clara em torno deles, medidos com o auxílio de paquímetro.

4.2.5 Análises *in situ*

As análises *in situ* foram realizadas para a avaliação comparativa entre a atividade inibitória da cepa de BAL selecionada e de nisina comercial (Nisaplin®) 200 ppm frente à cepa de *L. monocytogenes* selecionada, que foram inoculadas nas amostras de salsichas.

Todas as análises foram realizadas em duplicata, com seis repetições.

4.2.5.1 Preparação das amostras de salsichas

Foram adquiridas, no comércio local, 11 embalagens de salsichas a vácuo de mesma marca e lote, cada uma contendo 12 salsichas que foram conduzidas ao laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Faculdade de Farmácia da UFMG, para a preparação das amostras experimentais que utilizaram

embalagens plásticas de primeiro uso para vácuo, medindo 15 x 25 x 0,15 mm. As embalagens comerciais foram higienizadas externamente com álcool etílico 70%, em câmara de fluxo laminar para microbiologia, onde foram abertas assepticamente com tesoura estéril. Em seguida, salsichas de cada embalagem foram distribuídas aleatoriamente nas embalagens experimentais, com duas salsichas em cada embalagem.

As amostras de salsichas foram pesadas individualmente, retirando-se como tara o peso da embalagem e do fecho (6,29 g). Cada embalagem foi identificada com o peso da amostra correspondente, para posterior cálculo de contagem microbiana por grama de salsicha. As amostras apresentaram um peso médio de $81,92 \pm 1,87$ g cada uma, sendo mantidas sob refrigeração. Ao final, as amostras de salsichas totalizaram 132 embalagens plásticas contendo 2 unidades cada uma, sendo então lacradas com fechos de arame recapados de material PVC branco, medindo 7 cm (Figura 3, a e b).

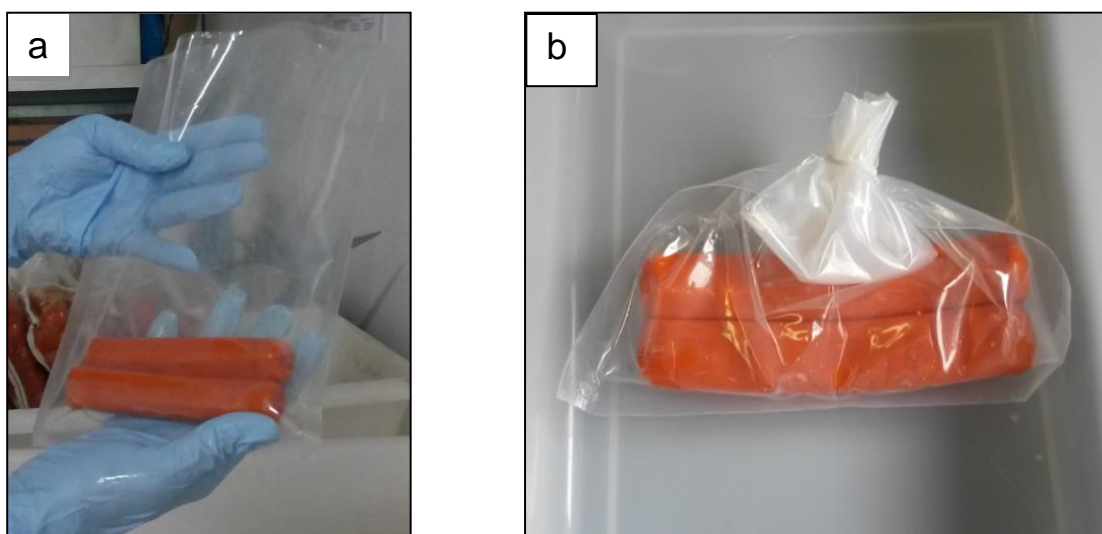


Figura 3 – Preparação das amostras experimentais de salsicha em embalagem plástica

4.2.5.2 Irradiação das amostras de salsichas

As 132 amostras de salsichas preparadas foram então acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo reciclável em quantidade suficiente para que, durante o transporte e a irradiação, a temperatura das amostras se mantivesse abaixo dos 10° C. As caixas foram imediatamente levadas ao Laboratório de

Irradiação Gama (LIG), do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), e submetidas à dose de 10 kGy de radiação gama, com o propósito de eliminação da microbiota residual das salsichas, evitando interferências nos resultados das análises, conforme descrito por Oliveira (2008). Utilizou-se o Irradiador Panorâmico Multipropósito de Categoria II (GB-127, Ottawa, Canadá) equipado com uma fonte de Cobalto-60 estocada a seco. As amostras foram colocadas a uma distância da fonte que resultou na taxa de dose de 3,6 kGy/h, em mesas rotatórias, permitindo a uniformidade de dose em todas as amostras.

As embalagens de salsichas irradiadas foram transportadas para o Laboratório de Tecnologia de Carnes, do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG, onde foram mantidas sob refrigeração em câmara de incubação refrigerada B.O.D. (marca Fanem®, modelo 347) ajustada e mantida a 10°C, conforme recomendações do fabricante das salsichas.

4.2.5.3 Preparação dos inóculos selecionados e aplicação da solução de Nisaplin®

4.2.5.3.1 BAL selecionada

A cepa da BAL selecionada foi ativada a partir de cultura congelada (microtubo a -20°C), transferindo uma alíquota de 100 µL para 5 mL de caldo MRS, seguida de incubação a 37°C, por 24 h, para crescimento. Após o crescimento, uma alíquota de 200 µL desse caldo ativado foi transferida para 10 mL de caldo MRS e novamente incubada a 37°, por 24 h. Desse crescimento, foi retirado um inóculo para os tratamentos BB e BL.

4.2.5.3.2 *Listeria monocytogenes* selecionada

A cepa de *L. monocytogenes* selecionada foi ativada a partir da cultura congelada, por inoculação em caldo BHI e incubação a 37°C, por 24 h. Uma alíquota de 200 µL da cultura ativada foi transferida para 10 mL de caldo BHI e novamente incubada a 37°, por 17 ± 1 h. Desse crescimento, retirou-se um inóculo para os

tratamentos BL, BLB e BLN.

4.2.5.3.3 Aplicação da solução de Nisaplin®

A partir da solução de 200 ppm de Nisaplin® preparada, aplicou-se, aos tratamentos BLN, 5 mL da solução em cada embalagem.

4.2.5.4 Inoculação dos tratamentos

As amostras irradiadas foram distribuídas nos seguintes tratamentos:

- BB – contendo a BAL selecionada
- BL – contendo a cepa de *L. monocytogenes* selecionada (controle)
- BLB – contendo a cepa de *L. monocytogenes* e a BAL
- BLN – contendo a cepa de *L. monocytogenes* e Nisaplin® 200 ppm

A inoculação de cada tratamento seguiu o esquema apresentado no Quadro 6. Ao final, foram formados 6 blocos (repetições), cada um contendo 22 embalagens de amostras de salsichas, distribuídos entre os quatro tratamentos (BB, BL, BLB e BLN), em estocagem refrigerada, analisados em 5 tempos denominados T0, T1, T2, T4 e T8, que correspondem ao início (inoculação dos tratamentos), 1ª, 2ª, 4ª e 8ª semanas de armazenamento, respectivamente; e mais duas embalagens – para cada bloco – destinadas ao teste de esterilidade das salsichas (T0 e T8).

A inoculação, em cada um dos tratamentos, foi feita com a abertura da embalagem de forma asséptica, em fluxo laminar, e a aplicação dos inóculos dos microrganismos selecionados (*L. monocytogenes* e/ou BAL) e/ou da solução de Nisaplin® 200 ppm na superfície das amostras de salsicha. Em seguida, as embalagens foram novamente lacradas com os fechos e as amostras foram manualmente homogeneizadas por cerca de cinco minutos cada. A inoculação de cada tratamento seguiu a programação apresentada na Figura 4.

A opção para utilização da diluição do inóculo da BAL selecionada e de *L. monocytogenes* baseou-se em recomendações de pesquisadores (JAY, 2005) e orientações internacionais a respeito de alimentos prontos para o consumo no varejo (ICMSF, 2002; EFSA/ECDC, 2014). A concentração de nisina foi fundamentada nas diretrizes do MAPA (BRASIL, 1998) para utilização em salsichas.

Quadro 6 - Inoculação dos tratamentos

Tratamento	Inóculo	Inoculação	Quantidade de inóculo/embalagem
BB	BAL selecionada	10^8	1 mL
BL	<i>L. monocytogenes</i> selecionada	10^4	1 mL
BLB	<i>L. monocytogenes</i> e BAL selecionada	10^4 10^8	1 mL 1 mL
BLN	<i>L. monocytogenes</i> e Nisina comercial	10^4 200 ppm	1 mL 5 mL

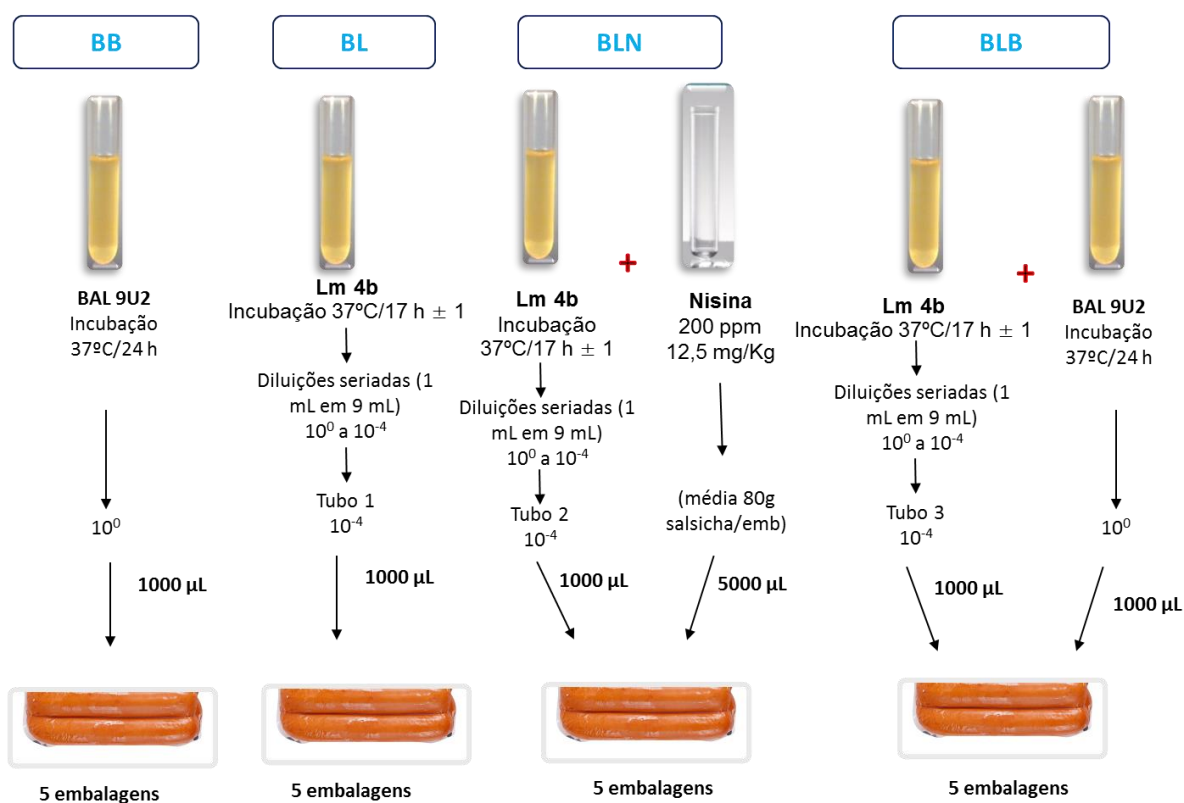


Figura 4: Esquema ilustrativo da inoculação dos tratamentos

No tratamento BB, 1 mL do inóculo de BAL, sem diluição, foi transferido para cada embalagem correspondente. No tratamento BL, foram realizadas diluições seriadas de 1 mL do inóculo de *L. monocytogenes* em 9 mL de água salina peptonada estéril até a obtenção da diluição 10^4 . Desta diluição, 1 mL foi transferido para cada embalagem correspondente. Para o tratamento BLB, 1 mL do inóculo de

BAL e 1 mL da diluição 10^4 de *L. monocytogenes* foram deslocados para a mesma embalagem correspondente. E o tratamento BLN, 1 mL da diluição 10^4 de *L. monocytogenes* e 5 mL de nisina foram transferidos para a mesma embalagem correspondente.

A primeira análise foi realizada logo após a inoculação dos tratamentos, e as demais amostras foram mantidas sob refrigeração em B.O.D., ajustada e mantida a 10°C , para as posteriores contagens durante os períodos de armazenamento.

Foram também efetuadas, no início da estocagem das amostras, as contagens dos inóculos da BAL e *L. monocytogenes* utilizados para a inoculação das amostras, com o objetivo de quantificar, de forma exata, o número de UFC inoculadas em cada tratamento.

Para isso, realizaram-se diluições decimais dos inóculos (BAL e *L. monocytogenes*) em solução salina peptonada estéril até aquela na qual se obteve uma adequada contagem das colônias. O método de contagem foi por espalhamento de uma alíquota de 100 μL da diluição ideal em placa de Petri contendo ágar MRS ou ágar BHI, até a completa absorção pelo ágar e posterior incubação a 37°C , por 24-48 horas. A leitura dos resultados foi feita por meio da contagem das colônias nas placas e expressa em UFC. mL^{-1} .

4.2.5.5 Análises de recuperação e contagem microbiana

As análises de recuperação para a contagem microbiana foram realizadas nas amostras de salsicha irradiadas dos 4 tratamentos: BL, BLN, BLB e BB, inoculados com *L. monocytogenes* 4b selecionada (controle), com *L. monocytogenes* 4b e nisina comercial, com *L. monocytogenes* 4b e *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 selecionada, e com *Leuconostoc mesenteroides* 9U2, respectivamente. Os tratamentos foram analisados ao longo do período de vida útil do produto, nos 5 tempos distintos: T0, T1, T2, T4 e T8, mantidos em estufa tipo B.O.D. a 10°C , que corresponde às condições de estocagem, segundo orientações do fabricante.

Para todos os tratamentos, procedeu-se à análise, de forma padronizada, iniciando pela abertura da embalagem contendo as amostras de salsichas, sendo em seguida aplicada uma alíquota de 2 mL de solução salina peptonada estéril para

adequado enxágue e recuperação da microbiota presente, com exceção do tratamento BLN no primeiro tempo de análise, no qual não foi necessária a aplicação da solução para recuperação, devido à presença de maior volume líquido na embalagem, relacionado aos 5 mL de solução de nisina adicionados. Todas as embalagens foram homogeneizadas manualmente por cerca de 5 minutos e, em seguida, foi recolhida uma alíquota de 1 mL para a análise.

A alíquota de 1 mL retirada foi transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina peptonada (10^{-1}), sendo então realizadas diluições sucessivas até a obtenção de uma adequada à contagem das colônias. O método de análise nesses tratamentos foi *spread plate*, com o espalhamento de uma alíquota de 100 μ L da diluição em placa de Petri contendo um ágar adequado à determinação.

Para o tratamento BB, utilizou-se ágar MRS, por se tratar do meio de cultura mais indicado para o crescimento da cultura láctica. Para as cepas de *L. monocytogenes*, foram testados o ágar MRS, BHI e Palcam, e comprovou-se o crescimento do patógeno em todos os meios, sendo necessário um meio seletivo para o desenvolvimento exclusivo destas cepas. Portanto, para os demais tratamentos - BL, BLN, BLB - por serem constituídos de cepas de *L. monocytogenes*, fez-se uso do Palcam ágar base (Acumedia®, Lansing, Michigan, EUA), acrescido de *Listeria Selective Supplement* (Himedia, Vadhani Industrial Estate, Mumbai, Índia), e posterior incubação a 37°C por 24-48 horas (Figura 5).

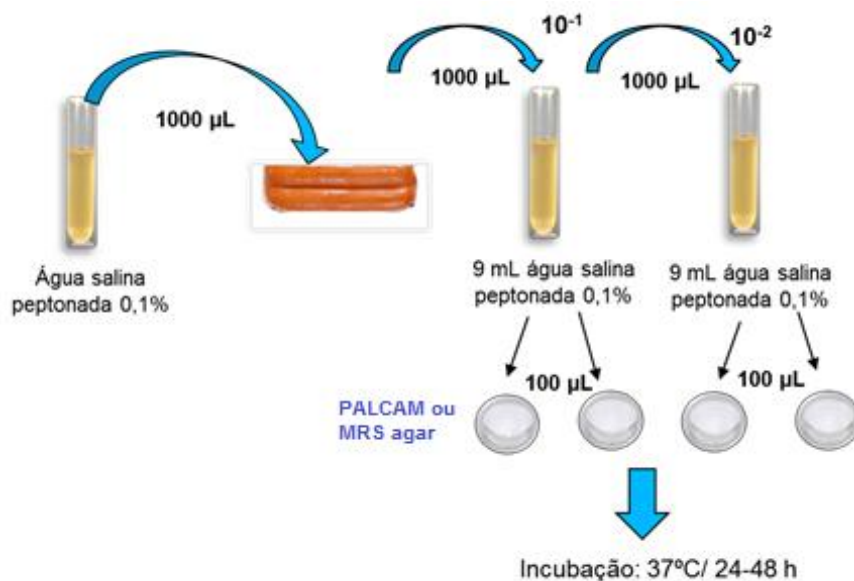


Figura 5 – Modelo ilustrativo da análise de recuperação e contagem microbiana

Após a incubação, procedeu-se à leitura, por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) nessas placas, em contador de colônias. Para o tratamento BB, o resultado foi obtido por meio da contagem das colônias de bactérias lácticas para verificação do seu crescimento, isoladamente, nas amostras de salsicha ao longo do período de armazenamento.

Para os demais tratamentos, obteve-se o resultado pela contagem das colônias de *L. monocytogenes* para verificação do crescimento da cepa isoladamente e também da interação desta com a BAL e com a nisina comercial. Este resultado foi obtido pela média do número de colônias contadas nas placas dividido pelo peso das amostras do tratamento correspondente expresso em UFC.g⁻¹. Posteriormente, transformou-se esta unidade para log UFC. g⁻¹.

As colônias da BAL caracterizam-se por seu pequeno tamanho e por serem claras no ágar MRS. Porém, as colônias de *L. monocytogenes* no ágar Palcam têm aspecto acinzentado-brilhante com formação de halo preto em torno delas. Nas Figuras 6a e 6b, são exibidos os aspectos de crescimento das colônias.



Figura 6a: Colônias de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 em MRS

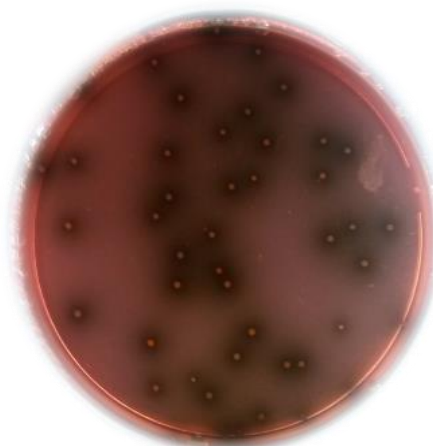


Figura 6b: Colônias de *L. monocytogenes* 4b em PALCAM

4.2.5.6 Teste de esterilidade das amostras

O teste de esterilidade comercial consistiu de análise para confirmação da ausência de microrganismos nas amostras quando submetidas à radiação, no início do experimento e ao final do período de armazenamento das amostras.

Para essa análise, duas embalagens contendo as amostras estéreis foram separadas e não inoculadas. As análises dividiram-se em duas etapas: no início, ou seja, no momento da inoculação dos tratamentos, e no final da vida de prateleira, quando da última análise, na 8ª semana.

Para isso, a embalagem foi aberta e introduziu-se 1 mL de água salina peptonada estéril. Em seguida, procedeu-se, manualmente, à homogeneização do líquido nas amostras por cerca de 5 minutos. Por *spread plate*, uma alíquota de 100 µL foi transferida para placa de Petri contendo ágar MRS e espalhada até completa absorção pelo ágar. Depois, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h, e procedeu-se à leitura por meio das contagens de possíveis colônias.

4.3 Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas através de 6 repetições em duplicata. Para as análises preliminares, *in vitro* (fase 1), dos testes inibitórios direto e indireto, representados pelos valores das médias das mensurações dos halos de inibição em mm, os dados foram averiguados por análise de variância ANOVA, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Para as análises seguintes, *in situ* (fase 2), de inoculação dos tratamentos, recuperação dos inóculos e contagem microbiana, em 5 tempos distintos através de 6 blocos representados pelos valores de log UFC. g⁻¹, os dados foram avaliados por análise de variância ANOVA, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para todas as análises, utilizou-se o software estatístico InfoStat, versão 2008 (DI RIENZO *et al.*, 2008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fase 1

5.1.1 Análises *in vitro*

Numa avaliação crítica dos métodos disponíveis para a seleção de BAL isoladas de carnes, De Martinis, Alves e Franco (2002) abordaram as diferentes técnicas existentes para os métodos de avaliação da atividade inibitória, indicando como comumente utilizados, numa triagem preliminar e para confirmação de atividade inibitória, os métodos de *Spot-on-the-lawn* e Difusão em poços.

5.1.1.1 Seleção das 4 cepas de BAL

Na fase 1, os testes e ensaios realizados com as 12 cepas de BAL avaliadas permitiram a seleção das 4 melhores por meio do teste de inibição direta pelo método *Spot-on-the-lawn*, que avaliou a atividade inibitória frente às 4 cepas de *L. monocytogenes*, tendo como critério de seleção os maiores valores de diâmetros dos halos (mm) combinados com os menores coeficientes de variação entre as culturas.

Foram então selecionadas 4 cepas de BAL, elegendo as BAL: *Lactococcus lactis* 3P, *Leuconostoc mesenteroides* 9U2, *Lactobacillus perolens* 17P2 e *Lactobacillus satsumensis* 23P3.

No Quadro 7, são apresentadas as 12 cepas de BAL avaliadas com as médias gerais dos valores de halos de inibição (mm) de BAL sobre cepas de *L. monocytogenes* pelo método *Spot-on-the-lawn*, pelo teste de atividade inibitória direta e seus respectivos coeficientes de variação.

Quadro 7 – Coeficientes de variação e médias gerais dos valores de halos de inibição (mm) de BAL sobre cepas de *L. monocytogenes* pelo método *Spot-on-the-lawn* - teste de atividade inibitória direta

BAL	Código	Média Geral (mm)	CV*
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	9U2	37,05	7,82%
<i>Lactococcus lactis</i>	3P	37	9,94%
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	23P3	33,65	7,78%
<i>Lactobacillus perolens</i>	17P2	33,3	11,04%
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	13U2	32,75	32,60%
<i>Lactococcus lactis</i>	3R	32,04	2,80%
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	18P	31,25	22,40%
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	11U1	29,25	25,87%
<i>Lactobacillus perolens</i>	11P3	28,7	46,32%
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	14U	27,4	17,03%
<i>Lactobacillus mali</i>	21U2	26,6	2,13%
<i>Lactobacillus casei</i>	17U	21,5	21,05%

* CV: Coeficiente de Variação

5.1.1.2 Teste de atividade inibitória direta por método *Spot-on-the-lawn*

Na Tabela 1, estão expressos os valores das médias dos halos de inibição (em mm) das cepas de BAL contra *L. monocytogenes*, pelo teste de atividade inibitória direta por método *Spot-on-the-lawn*.

Em relação à matriz alimentar que originou o cultivo de BAL avaliadas, das quatro culturas lácticas selecionadas neste teste que apresentaram maior atividade inibitória contra as cepas de *L. monocytogenes*, três eram BAL (75%) isoladas de kefir de leite (*Lactococcus lactis* 3P, *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 e *Lactobacillus satsumensis* 23P3), e apenas uma BAL (25%) isolada de kefir de água (*Lactobacillus perolens* 17P2).

Tabela 1 – Valores das médias dos halos de inibição (mm) de BAL sobre cepas de *L. monocytogenes* pelo método *Spot-on-the-lawn* - teste de atividade inibitória direta

BAL	Halos de inibição (mm)				Média Geral (BAL)
	Lm 1	Lm 1/2a	Lm 4a	Lm 4b	
<i>Lactococcus lactis</i>	15,43	13,92	14,89	22,91	16,79 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	10,45	10,65	14,08 ^{xy}	22,71 ^y	14,47 ^a
<i>Lactobacillus perolens</i>	12,97	7,97	14,31	16,24	12,87 ^{ab}
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	7,53	6,41	10,88	13,81	9,65 ^b
Média Geral (<i>L. monocytogenes</i>)	11,59 ^y	9,74 ^y	13,54 ^y	18,92 ^x	

a, b, c: Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

x, y, z: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Lactococcus lactis 3P, *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 e *Lactobacillus satsumensis* 23P3: isolados de kefir de leite; *Lactobacillus perolens* 17P2: isolado de kefir de água.

Lm 1: *L. monocytogenes* isolada de salsicha; Lm 1/2a: *L. monocytogenes* 1/2a; Lm 4a: *L. monocytogenes* 4a; Lm 4b: *L. monocytogenes* 4b.

Para nenhuma das cepas de *Listeria* (*L. monocytogenes* isolada de salsicha, *L. monocytogenes* 1/2a, *L. monocytogenes* 4a e *L. monocytogenes* 4b) houve diferença significativa entre os valores das médias de halos das BAL *Lactococcus lactis* 3P, *Leuconostoc mesenteroides* 9U2, *Lactobacillus perolens* 17P2 e *Lactobacillus satsumensis* 23P3 ($p > 0,05$). Ou seja, dentro de cada cepa de *L. monocytogenes*, as BAL são semelhantes entre si, apresentando espectros de inibição similares.

Analisando cada bactéria láctica isoladamente, *Lactococcus lactis* 3P, *Lactobacillus perolens* 17P2 e *Lactobacillus satsumensis* 23P3, não houve diferença significativa entre os tratamentos de *L. monocytogenes* isolada de salsicha, *L. monocytogenes* 1/2a, *L. monocytogenes* 4a, e *L. monocytogenes* 4b ($p > 0,05$). Porém, para *Leuconostoc mesenteroides* 9U2, houve diferença significativa entre as diferentes cepas de *L. monocytogenes*, apresentando maior valor médio de halo para *L. monocytogenes* 4b, que, por sua vez, não diferiu estatisticamente de *L. monocytogenes* 4a. *L. monocytogenes* isoladas de salsicha, 1/2a e 4a foram semelhantes entre si ($p > 0,05$).

Considerando-se os valores das médias gerais dos halos de inibição, em mm, de cada BAL, a menor média de medida de halo entre as cepas de *L. monocytogenes* foi a de *Lactobacillus satsumensis* 23P3 (9,65 mm), que obteve

diferença estatística perante as demais ($p \leq 0,05$). Porém, *Lactobacillus satsumensis* 23P3 foi semelhante a *Lactobacillus perolens* 17P2 ($p > 0,05$). As demais cepas de BAL foram semelhantes entre si ($p > 0,05$), com maior média de medida de halo para *Lactococcus lactis* 3P (16,79 mm), seguida de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 (14,47 mm), que não apresentaram diferença significativa da BAL *Lactobacillus perolens* 17P2 (12,87 mm).

Examinando-se os valores das médias gerais dos halos de inibição, em mm, de cada *L. monocytogenes*, a que apresentou maior sensibilidade frente às cepas de BAL foi *L. monocytogenes* 4b, exibindo maior média de valor de halo (18,92 mm), que apresentou diferença significativa perante as demais ($p \leq 0,05$). As cepas de *L. monocytogenes* 4a, com média de 13,54 mm, *L. monocytogenes* isolada de salsicha, com média de 11,59 mm, e *L. monocytogenes* 1/2a, com média de 9,74 mm, são semelhantes entre si ($p > 0,05$).

Portanto, a cepa de BAL que obteve maior média de valor de halo sobre as cepas de *L. monocytogenes* foi a *Lactococcus lactis* 3P, que não apresentou diferença estatística da BAL *Leuconostoc mesenteroides* 9U2. *L. monocytogenes* que demonstrou maior sensibilidade perante as culturas lácticas foi a 4b.

Diante dos resultados apresentados pelas BAL e testes de adaptação da cepa ao frio, selecionou-se, no teste de inibição direta pelo método *Spot-on-the-lawn*, *Leuconostoc mesenteroides* 9U2, que apresentou halos expressivos e melhor aclimatação, se comparada às demais, sob a temperatura de armazenamento das amostras de salsicha utilizadas no experimento (10°C).

Na Figura 7, é apresentado o crescimento das colônias das 4 cepas de BAL com maior diâmetro para 3P e 9U2 e sua atividade antimicrobiana contra a cepa de *L. monocytogenes* 4b por método *Spot-on-the-lawn* do teste de atividade inibitória direta.

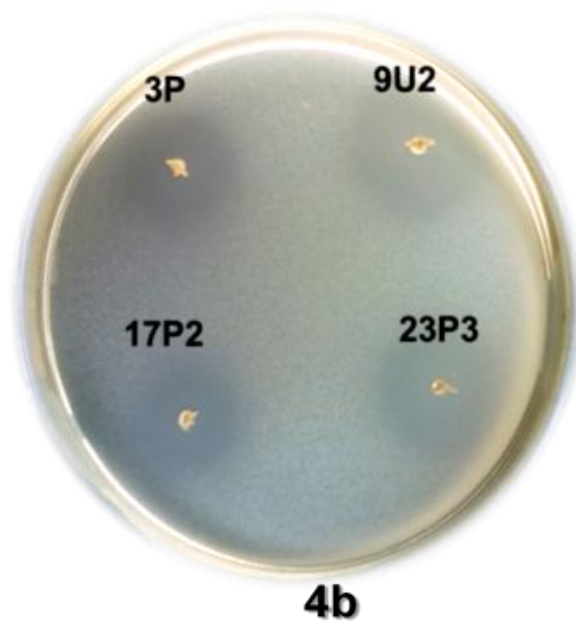


Figura 7 – Crescimento das colônias de BAL e sua atividade antimicrobiana contra cepa de *L. monocytogenes* 4b por método *Spot-on-the-lawn* do teste de atividade inibitória direta

3P: *Lactococcus lactis*; 9U2: *Leuconostoc mesenteroides*; 17P2: *Lactobacillus perolens* e 23P3: *Lactobacillus satsumensis*.

Na Figura 8, são demonstradas as médias dos valores de halos de inibição (em mm) das cepas de BAL dentro de cada conjunto de *L. monocytogenes*.

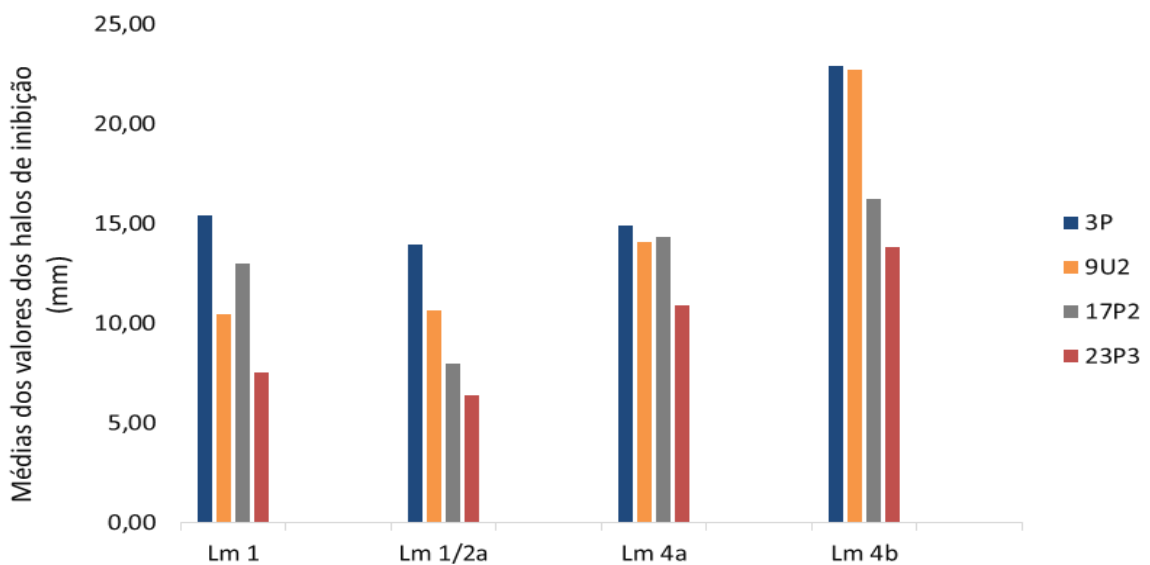


Figura 8 - Valores das médias dos halos de inibição (em mm) de cada cepa de BAL dentro de cada cepa de *L. monocytogenes*

Quanto ao método, utilizando diferentes inibições *in vitro*, Lewus e Montville (1991) observaram que o método *Spot-on-the-lawn* é mais rápido, fácil e reproduzível - se comparado aos demais comumente relatados na literatura.

No tocante ao estudo, similarmente a este, Santos *et al.* (2003), trabalhando com microrganismos de grãos de kefir, isolaram 58 cepas de *Lactobacillus* spp. (*L. kefir*, *L. brevis*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. delbruekii*, *L. acidophilus* e *L. kefiranofaciens*) com atividade antimicrobiana em teste *Spot-on-the-lawn* contra diversos patógenos, incluindo *L. monocytogenes*. De todos *Lactobacillus* isolados de kefir, 50% inibiram cepas de *L. monocytogenes*.

Em teste inibitório de antagonismo direto, Carasi *et al.* (2014) utilizaram cepas de *Enterococcus durans*, isoladas de diferentes grãos de kefir e de diferentes bebidas de kefir, frente a microrganismos patogênicos, tais como *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes*. De 13 cepas isoladas, pelo menos 2 foram capazes de inibir todos os microrganismos patogênicos, sendo que cada cepa foi capaz de inibir pelo menos 2 bactérias patogênicas diferentes, e 6 inibiram, de algum modo, *L. monocytogenes*.

Diferentemente deste trabalho, Dias (2011), em um estudo sobre a atividade antimicrobiana de microrganismos presentes em grãos de kefir, utilizando teste inibitório direto com cepas do gênero *Lactobacillus*, observou a presença de halos de inibição contra *L. monocytogenes*, porém pouco expressivos. Contudo, a atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* não foi mantida quando utilizado o sobrenadante da cultura.

5.1.1.3 Sobrenadantes livres de células neutralizados e filtrados

Em testes preliminares, os sobrenadantes livres de células utilizados no teste de inibição indireta por método Difusão em poços foram submetidos a duas condições: filtração (SF) e neutralização e filtração (SNF).

Quanto ao processo de neutralização e filtração para obtenção do SNF, a neutralização com NaOH e filtração em milex® (0,22 µm), não foram obtidos resultados positivos quanto à formação de halos de inibição nas placas, com pH médio inicial das culturas lácticas entre 3,89-3,93 e pH final em 6,2 após a

neutralização.

Semelhante a este estudo, alguns autores - que isolaram BAL de kefir - analisaram o pH dos sobrenadantes antes da neutralização e encontraram valores de pH similares variando entre 4,0 e 5,0 (DIAS, 2011) e entre 3,80 e 4,39 (AUAD, 2014) para diferentes espécies de cepas. Os autores também não obtiveram resultados positivos utilizando SF e SNF contra *L. monocytogenes*. Feldmann (2015), analisando a capacidade de acidificação de diferentes cepas de BAL isoladas de kefir, obteve, após 24 h de incubação, os valores entre 3,73 e 3,85.

No presente trabalho, no caso do SF, utilizando o sobrenadante sem neutralização e somente filtrado, havia a formação de halos, porém bastante tênues, não significativos. Diante disso, percebeu-se que o processo de neutralização do sobrenadante não implicava em resultados positivos de inibição. Por fim, o processo de filtração dos sobrenadantes gerava resultados positivos em algumas culturas de BAL e *L. monocytogenes*, mas não significativos com a presença de halos sutis.

Neste caso, inferiu-se que os metabólitos produzidos pelas BAL (polipeptídios) possivelmente eram retidos no processo de filtração, pois quando se eliminou esta etapa do processo, houve a formação de halos de inibição mais expressivos nas placas. Portanto, os sobrenadantes utilizados nos testes de inibição indireta por método Difusão em poços foram aqueles livres de células, puros, sem a utilização de nenhum recurso adicional, como neutralização ou filtração.

5.1.1.4 Teste de atividade inibitória indireta por método Difusão em poços

Na Tabela 2, são apresentados os resultados qualitativos da presença dos halos de inibição observados a partir de uma zona mais clara em torno dos poços dos sobrenadantes livres de células obtidos de BAL sobre as cepas de *L. monocytogenes* no teste de inibição indireta pelo método Difusão em poços.

Tabela 2 – Atividade inibitória indireta dos sobrenadantes livres de células obtidos de BAL sobre cepas de *L. monocytogenes* pelo método Difusão em poços

BAL	<i>L. monocytogenes</i>			
	Lm 1	Lm 1/2a	Lm 4a	Lm 4b
<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	+	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	++	++	++
<i>Lactobacillus perolens</i>	-	-	-	-
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	-	+	+	+

(-): ausência de halo; (+): presença de halo; (++) : presença de halo > 5mm.

Lactococcus lactis 3P, *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 e *Lactobacillus satsumensis* 23P3: isolados de kefir de leite; *Lactobacillus perolens* 17P2: isolado de kefir de água.

Lm 1: *L. monocytogenes* isolada de salsicha; Lm 1/2a: *L. monocytogenes* 1/2a; Lm 4a: *L. monocytogenes* 4a; Lm 4b: *L. monocytogenes* 4b.

Neste teste, a forma de representação qualitativa foi necessária a partir da dificuldade de mensuração dos halos. Alguns sobrenadantes livres de células das culturas lácticas não apresentaram halos e outros exibiram halos tênues. Apenas o sobrenadante obtido de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 apresentou halos mais definidos, com medições dos diâmetros (em mm) maiores que 5 mm para a maior parte das cepas de *L. monocytogenes*, com destaque para a 4b.

Oliveira (2008) constatou que o resultado inibitório pelo teste Difusão em poços não ocorre em uma ampla variedade de cepas, seja de BAL ou outros tipos de microrganismos.

Lewus e Montville (1991) detectaram a presença de bacteriocinas produzidas por BAL por meio de três diferentes métodos de antagonismo: *Spot-on-the-lawn*, Difusão em poços ou *Well-diffusion assay* e *Flip streak* - este último através de estriamento em ágar da cepa produtora de bacteriocina perpendicularmente à cepa reveladora, no lado inverso do ágar. Quanto à comparação do método, os autores concluíram que o método *Flip streak* não apresenta praticidade, no *Spot-on-the-lawn* as zonas de inibição foram mais facilmente visualizáveis, e o método Difusão em poços pode resultar em muitos falsos-negativos, se comparado ao anterior, pois somente algumas cepas com resultado positivo no método *Spot-on-the-lawn* confirmam o mesmo resultado neste último teste.

Em um estudo, Auad (2014) avaliou BAL isoladas de grãos de kefir utilizando os dois métodos de inibição por método *Spot-on-the-lawn* e Difusão em

poços, e observou que o segundo possui limitações em detrimento do primeiro. Nenhum dos sobrenadantes filtrados livres de células das BAL (SF) e sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) demonstrou atividade inibitória contra diferentes cepas de *L. monocytogenes*.

Um estudo realizado por Dias (2011) sobre a atividade antimicrobiana de microrganismos presentes em grãos de kefir, utilizando SF e SNF de *Lactobacillus*, também constatou que as amostras não apresentaram atividade inibitória contra cepas de *L. monocytogenes*.

Hartmann, Wilke e Erdmann (2011), em experimento utilizando os métodos direto e indireto, avaliaram o efeito antimicrobiano das cepas de BAL (ordem *Lactobacillales* e um isolado de *Staphylococcus sciuri*) sobre *L. monocytogenes*, *E. faecalis* e *S. enterica*. Os autores concluíram que, no método direto, houve um forte efeito inibitório de todas as cepas antagonistas sobre *L. monocytogenes*; porém, no método indireto, o efeito inibitório não foi perceptível para todos os SNF das BAL.

Diferentemente do encontrado nestes estudos, Rosa (2001) purificou e avaliou a bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a isolada de linguiça frescal na inibição de diferentes espécies de *Listeria*, incluindo *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para a avaliação da sensibilidade dos microrganismos patogênicos pela bacteriocina, foram comparados dois métodos de inibição: *Spot-on-the-lawn* e Difusão em poços. A autora concluiu que ambos os testes foram igualmente eficientes, e, no segundo, utilizando-se SF e SNF.

Lewus e Montville (1991) analisaram alguns efeitos que podem reforçar os resultados falso-negativos do método Difusão em poços, como agregação, bacteriocinas não difundidas, inativação de proteases e efeitos de concentração. E ainda acrescentaram que a sensibilidade do teste pode ser aumentada, ampliando o tamanho do poço para transposição de maior número de amostra e alongando-se o tempo para a bacteriocina ser difundida no ágar.

Na Figura 9, são apresentadas as atividades antimicrobianas dos sobrenadantes livres de células obtidos das BAL contra cepa de *L. monocytogenes* 4b por método Difusão em poços do teste de atividade inibitória indireta. Os resultados mostraram a presença dos halos de inibição observados a partir de uma zona mais clara em torno dos poços, de forma definida, porém sutil.



4b

Figura 9 – Atividade antimicrobiana dos sobrenadantes livres de células obtidos de BAL contra cepa de *L. monocytogenes* 4b por método Difusão em poços

3P: *Lactococcus lactis*; 9U2: *Leuconostoc mesenteroides*; 17P2: *Lactobacillus perolens* e 23P3: *Lactobacillus satsumensis*.

5.2 Fase 2

A BAL selecionada para inoculação nas amostras de salsicha na fase 2 foi a cepa de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2, pela expressividade dos diâmetros dos halos obtidos nos testes inibitórios e pela melhor aclimação à temperatura de armazenamento das amostras do experimento, a 10°C, se comparada à *Lactococcus lactis* 3P. A cepa de *L. monocytogenes* selecionada para esta fase foi a 4b, devido aos melhores resultados apresentados em ambos os testes.

De Martinis, Alves e Franco (2002) ressaltaram a importância da utilização dos testes de atividade inibitória para seleção preliminar e certificação de atividade inibitória das BAL. Contudo, é de grande importância a realização dos testes utilizando alimentos para avaliar a capacidade de utilização em biopreservação.

O resultado da aplicação de BAL em matrizes alimentares complexas é diferente da sua utilização *in vitro*, pois, conforme Hartmann, Wilke e Erdmann (2011), ao contrário do ágar, no alimento os compostos antimicrobianos podem

interagir com a microbiota endógena natural, com as enzimas formadas no produto ou, ainda, com outros componentes específicos do próprio alimento.

5.2.1 Análises *in situ*

5.2.1.1 Seleção da marca de salsicha

No Quadro 8, apresentam-se as marcas das amostras de salsichas A, B e C, com os respectivos resultados da inoculação e recuperação (UFC.g⁻¹) após 1 semana de incubação a 10°C, em B.O.D., referentes às contagens das colônias de BAL e *L. monocytogenes* selecionadas.

Quadro 8 – Resultados da inoculação e recuperação (UFC.g⁻¹) das cepas de BAL e *L. monocytogenes* nas marcas de salsicha

Marcas	Inoculação (UFC. g ⁻¹)		Recuperação (UFC. g ⁻¹)		Características
	BAL	Lm*	BAL	Lm*	
A	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	Houve inibição do crescimento das cepas
B	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	N/R**	Dificuldade de recuperação da alíquota por presença de fragmentos de salsicha
C	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁸	10 ⁹	Crescimento proporcional ideal

* Lm: *Listeria monocytogenes*

**N/R: Não recuperado

Na amostra de salsicha da marca A, a contagem de BAL obteve redução de 1,0 ciclo logarítmico e a de *L. monocytogenes* manteve o crescimento das cepas após 1 semana de incubação. Estes dados indicam a possibilidade da presença de ingredientes inibidores nas amostras, que consiste em um parâmetro inadequado para a parte experimental na fase 2.

Na amostra de salsicha da marca B, houve redução de 1,0 ciclo logarítmico para a contagem de BAL, e, para a contagem de *L. monocytogenes*, não

foi possível a realização da análise devido à presença de fragmentos da amostra dispersos na embalagem, o que impossibilitou a recuperação da alíquota e dificultou a obtenção de resultados confiáveis.

Na amostra de salsicha da marca C, houve o crescimento de 2,0 ciclos logarítmicos para a BAL e 4,0 ciclos para a cepa de *L. monocytogenes*. A recuperação e contagem das cepas bacterianas foram proporcionais, sem a inibição do crescimento e/ou presença de pequenos fragmentos de salsicha. Portanto, esta foi a marca ideal selecionada para ser utilizada na fase 2.

5.2.1.2 Inoculação nas amostras de salsichas

As amostras de salsicha foram inoculadas, em sua superfície, nos tratamentos, pelas cepas de BAL *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 e pela cepa de *L. monocytogenes* 4b selecionadas nos testes preliminares de atividade inibitória indireta.

Segundo Barros, Kunigk e Jurkiewicz (2010), o crescimento de microrganismos deteriorantes em embalagens a vácuo ocorre, principalmente, na superfície do produto, podendo ser aplicado o composto antimicrobiano apenas na superfície de produtos cárneos cozidos. A aplicação pode ser feita mergulhando o produto na substância antimicrobiana, utilizando um spray contendo a substância, revestindo o produto com um gel comestível ou até mesmo incluindo no sistema de embalagem, sendo este último utilizado no presente estudo.

Segundo o mesmo autor, a adição de substâncias antimicrobianas na superfície do produto facilita a sua distribuição, reduz a interação com componentes da carne e melhora a atividade antimicrobiana.

A quantificação inicial desses inóculos foi necessária para se estabelecer o número de células bacterianas viáveis inicial e a necessidade ou não de diluição para a inoculação nos tratamentos, e, ainda, para o acompanhamento do desenvolvimento das cepas ao longo do período de armazenamento.

5.2.1.2.1 Quantificação dos inóculos das cepas de *L. monocytogenes* 4b e *Leuconostoc mesenteroides* 9U2

Cada inóculo foi quantificado no momento da inoculação dos tratamentos de cada bloco (repetições). Os resultados das contagens das colônias dos inóculos das cepas da BAL *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 e *L. monocytogenes* 4b, em cada repetição, e suas respectivas médias são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados das contagens dos inóculos das cepas de BAL *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 e *L. monocytogenes* 4b

Inóculos	Repetições (log UFC.mL ⁻¹)						Média (log UFC.mL ⁻¹)
	1	2	3	4	5	6	
<i>L. mesenteroides</i> 9U2	8,79	7,99	8,29	8,39	8,32	8,39	8,43
<i>L. monocytogenes</i> 4b	9,00	8,99	9,10	8,93	9,20	9,06	9,06

O inóculo de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 variou nas repetições entre 7,99 log UFC. mL⁻¹ e 8,79 log UFC.mL⁻¹, com média de 8,43 log UFC.mL⁻¹, que foi inoculada diretamente em cada tratamento, sem necessidade de diluições.

O inóculo de *L. monocytogenes* 4b variou nas repetições entre 8,93 log UFC.mL⁻¹ e 9,20 log UFC.mL⁻¹, com média de 9,06 log UFC.mL⁻¹. Por se tratar de uma contagem muito alta, foram necessárias sucessivas diluições até alcançar 10⁴ UFC.mL⁻¹ para inoculação nos tratamentos, pois o resultado da contagem da inoculação, quando dividido pelo peso de cada tratamento (81,92 ± 1,87 g), seria de 10² UFC.g⁻¹ por tratamento.

A opção de inoculação de 10⁴ UFC.mL⁻¹ de *L. monocytogenes* para obtenção de 10² UFC.g⁻¹ em cada tratamento ocorreu com base em orientações da *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF) - de que até 10².g⁻¹ de *L. monocytogenes* em salsichas pode ser considerado aceitável para indivíduos saudáveis (ICMSF, 2002).

Da mesma forma, segundo a *European Food Safety Authority* (EFSA), o limite legal estabelecido em alimentos prontos para o consumo no varejo é de 10² UFC.g⁻¹, representando um risco aceitável (EFSA/ECDC, 2014).

Para Jay (2005), a microbiota naturalmente presente no alimento deve ser maior, em termos de células viáveis, que o microrganismo a ser inibido. O que

justifica, neste estudo, a cepa de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 ter uma contagem de inoculação superior (10^8 UFC.mL⁻¹) quando comparada à de *L. monocytogenes* (10^2 UFC.mL⁻¹) em cada tratamento.

5.2.1.2.2 Quantificação das populações de *L. monocytogenes* e de *Leuconostoc mesenteroides* por análises de recuperação

As análises de recuperação foram realizadas por contagem microbiana nas amostras de salsicha irradiadas para os 4 tratamentos: BL, BLN, BLB e BB, ao longo do período de vida útil do produto, relacionados aos 5 tempos de análise: T0, T1, T2, T4 e T8, mantidos em estufa tipo B.O.D. a 10°C.

5.2.1.3 Avaliação da viabilidade de *L. monocytogenes*

São apresentadas, na Tabela 4, as concentrações iniciais e as variações das médias das contagens de *L. monocytogenes* (log UFC.g⁻¹) dos tratamentos BL, BLN e BLB nos diferentes intervalos de tempo.

Tabela 4 – Concentração inicial e variações observadas nas médias das contagens de *L. monocytogenes* (log UFC.g⁻¹) entre os tratamentos nos diferentes intervalos de tempo

Tratamentos	Tempos					Total de variação
	T0	T1	T2	T4	T8	
BL	2,77 ^{ax}	3,68 ^{axy}	1,91 ^{axz}	0,53 ^{az}	-0,23 ^{azr}	5,90 ^a
BLN	1,55 ^{ax}	3,14 ^{aby}	2,89 ^{abxy}	1,17 ^{axz}	-0,06 ^{az}	7,14 ^a
BLB	2,66 ^{ax}	1,64 ^{bxy}	0,93 ^{acy}	0,74 ^{ay}	-0,58 ^{ayz}	2,73 ^b

a, b, c: Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey.

x, y, z: Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey.

BL: *L. monocytogenes* 4b (controle); BLN: *L. monocytogenes* 4b e nisina comercial; BLB: *L. monocytogenes* 4b e BAL *Leuconostoc mesenteroides* 9U2.

Em T0, os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), mostrando que, logo após a inoculação dos tratamentos, foram obtidas contagens de *L. monocytogenes* constantes e semelhantes entre si. Este resultado indica que tanto a nisina quanto a cepa de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2

apresentaram resultados de inibição semelhantes frente às contagens de *L. monocytogenes*, imediatamente após a inoculação. Embora não se tenha observado diferença significativa entre os tratamentos, numericamente, BLN apresentou a menor contagem e o controle à maior contagem de *L. monocytogenes*.

Em T1, o tratamento BL aumentou 3,68 ciclos logarítmicos e BLB aumentou apenas 1,64 ciclos quanto à contagem de *L. monocytogenes*, apresentando diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$). Os tratamentos BL e BLN não apresentaram diferença significativa entre si. Embora BLN e BLB sejam semelhantes ($p > 0,05$), este resultado sugere a eficiência da cepa de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 na inibição de *L. monocytogenes* logo na primeira semana, com redução de até dois ciclos logarítmicos de crescimento em comparação ao tratamento controle.

Em T2, o tratamento controle apresentou semelhança entre os demais tratamentos ($p > 0,05$); no entanto, BLN e BLB são diferentes estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Comparativamente, o maior aumento, com quase 3,0 ciclos logarítmicos na contagem de *L. monocytogenes*, foi para o tratamento BLN, e o menor (com menos de 1,0 ciclo logarítmico), para o tratamento BLB, comprovando mais uma vez o efeito inibitório da cepa de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 se comparado à nisina, na segunda semana de armazenamento. Estes resultados sugerem que a nisina, na concentração utilizada (200 ppm), ao longo do tempo de armazenagem, não foi suficiente para a inibição do patógeno.

A atividade inibitória da BAL frente a diversos microrganismos envolve vários mecanismos, como a competição por nutrientes, competição pelo local e, ainda, a criação de um ambiente desfavorável pela produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, dióxido de carbono e compostos antimicrobianos (ADAMS, 1999).

A utilização de BAL psicotróficas selecionadas auxilia na redução do risco de crescimento de patógenos na forma vegetativa e colabora na inibição de *L. monocytogenes* em produtos cárneos perecíveis, sendo que a formação de ácido láctico é o mecanismo de ação mais importante (LÜCKE, 2000).

Um estudo *in vitro* realizado por Martinez e De Martinis (2006) sobre o efeito de uma bacteriocina produzida por *Leuconostoc mesenteroides* 11, isolada de peito de frango, no controle da multiplicação de *L. monocytogenes* 4b avaliadas em duas temperaturas distintas, percebeu-se que, a 8°C, a bacteriocina inibiu

parcialmente o patógeno; porém, a 15°, não foi capaz de impedir seu desenvolvimento. Os autores não sugeriram o uso da bacteriocina semipurificada como único obstáculo para impedir o desenvolvimento de *L. monocytogenes* nos alimentos, mas também o uso de baixas temperaturas como efeito sinérgico para elevar a estabilidade da bacteriocina na biopreservação dos alimentos.

Os autores concluíram que a escolha de uma cultura de proteção ou bacteriocina purificada para a conservação de carnes é específica para cada caso, especialmente com cepas do gênero *Leuconostoc*, que merecem ser cuidadosamente avaliadas para cada aplicação.

Uma pesquisa *in vitro* realizada por Réchard *et al.* (1992) utilizando uma bacteriocina purificada, denominada Mesentericina Y 105, produzida por *Leuconostoc mesenteroides* Y 105 isolada de leite de cabra, na inibição de 14 cepas de *Listeria* spp., demonstrou efeito bactericida para *L. monocytogenes*.

Em T4, todos os tratamentos apresentaram semelhanças entre si ($p>0,05$), sugerindo um crescimento proporcional e constante na contagem de *L. monocytogenes* entre eles. Já em T8, houve uma redução na contagem do patógeno em todos os tratamentos, que são semelhantes entre si ($p>0,05$), demonstrando uma estabilização no crescimento do patógeno após 1 mês até o final do período de armazenamento.

No total, quanto à taxa de variação das médias de contagens de *L. monocytogenes* dos tratamentos, BLB apresentou diferença significativa entre os demais ($p\leq 0,05$), com o menor aumento na contagem até o final do período de armazenamento, demonstrando a eficiência da cepa de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 na inibição do patógeno. O tratamento BLN apresentou semelhança estatística a BL ($p>0,05$), com uma taxa de variação de crescimento na contagem de *L. monocytogenes* maior que o controle.

Este mesmo resultado foi observado por Kruger (2006), que avaliou o efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de orégano (O.E.O) e nisina, individualmente e em combinação, na inibição de *Listeria monocytogenes* Scott A *in vitro* e em linguiça frescal. As amostras foram experimentalmente contaminadas com níveis de 10^6 UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes*, armazenadas a 5°C e analisadas por 10 dias. A utilização de 0,5% (v/v) de O.E.O. isoladamente não conferiu proteção ao produto, ficando as contagens semelhantes ao controle. No entanto, uma redução

inicial na contagem de *L. monocytogenes*, logo que entrou em contato com o microrganismo, foi observada quando 200 ppm de nisina foram utilizados isoladamente (redução de 2 ciclos logarítmicos) e também quando houve a combinação com O.E.O. foram reduzidos 4 ciclos logarítmicos. Porém, após 24 h, as células sobreviventes do patógeno multiplicaram-se mais rapidamente na formulação combinada do que nas formulações controle, em que não foram adicionados os compostos antimicrobianos.

O autor afirmou que esta redução inicial tem efeito inibitório imediato, sugerindo uma ação bactericida, mas limitada, uma vez que as contagens do patógeno aumentam no decorrer do tempo de vida útil das amostras.

Estes resultados corroboram com os de outros estudos que demonstram que a nisina utilizada isoladamente em matrizes alimentares não possui efeito inibitório satisfatório sobre cepas de *L. monocytogenes* se comparado quando ela é utilizada em combinação com outras substâncias, como ácidos orgânicos e seus sais (ZDANSKI, 2011).

Em pH elevado, a solubilidade e a atividade da nisina decrescem, sendo este um dos maiores desafios enfrentados pelas indústrias de alimentos. Somado a isso, a utilização de nisina contra *L. monocytogenes* é limitada, pelo surgimento de cepas nisina-resistentes que têm seu desenvolvimento acelerado pelo uso indiscriminado da nisina em altas concentrações nos alimentos. A temperatura de armazenamento tem influência sobre esta resistência microbiana, quando aumentada acima de 4°C até aproximadamente 10°C (THEIVENDRAN, HETTIARACHCHY e JOHNSON, 2006).

Barros, Kunigk e Jurkiewicz (2010), em estudo de avaliação da eficiência da nisina utilizada em tripa natural de salsichas para o controle de microrganismos deteriorantes, utilizaram ácido fosfórico 0,1% para hidratação das tripas, nisina 200 ppm e diferentes temperaturas (4°C e 10°C). Os autores observaram que o efeito inibitório da nisina foi potencializado na presença de ácido e em temperaturas mais baixas (4°C).

Portanto, um dos principais problemas de uso da nisina em produtos cárneos é sua baixa solubilidade no pH da carne. Salsichas têm o valor de pH considerado neutro, podendo variar, com tendência a queda, no decorrer do tempo de armazenamento. Em vários trabalhos, os valores de pH encontrados foram de

6,10 e 6,20 (AASLYNG, VESTERGAARD e KOCH, 2014), 6,34 no início, e final de 5,88 (BATTISTELLA, 2008), início com 6,80 e final com 5,67 (FERRACCIOLI, 2012), 6,30 no início e 4,80 no final (ZDANSKI, 2011).

Para Ferraccioli (2012), essa tendência a queda do pH das salsichas ao longo do período de armazenamento deve-se a fatores como: características do estabilizante e antioxidante utilizados no processo de fabricação, bem como a possibilidade de desenvolvimento de bactérias lácticas que reduzem naturalmente o pH pela produção de ácido.

Neste estudo, como os tratamentos foram submetidos à irradiação e, assim, houve eliminação da microbiota natural do produto, o pH das salsichas manteve-se alto durante todo o período de armazenamento, dificultando a solubilidade da nisina no produto.

Theivendran, Hettiarachchy e Johnson (2006) observaram, em seus estudos, que o efeito inibitório da nisina é limitado, comparando-se a matrizes alimentares e meios líquidos.

Ko *et al.* (2001) concluíram, em suas pesquisas, que ambientes com uma maior hidrofobicidade e maior acidez exercem melhor efeito inibidor da nisina sobre *L. monocytogenes*.

Analisando a taxa de variação das médias de contagens entre os tempos, todos os tratamentos apresentaram aumento progressivo de contagens de *L. monocytogenes* até a 4ª semana e redução na 8ª semana.

Em relação aos tempos de contagem de *L. monocytogenes*, obtiveram-se comportamentos diferentes entre os tratamentos. BL apresentou um aumento constante na contagem desde o momento imediato após a inoculação até a segunda semana, sendo semelhantes entre si ($p > 0,05$), e depois apresentando o mesmo resultado constante a partir desse tempo até o final do período de armazenamento, não mostrando diferença estatística ($p > 0,05$). T1 não é semelhante estatisticamente de T2 ($p \leq 0,05$) e dos demais tempos, sendo que, nesta primeira semana, houve um aumento brusco na contagem de *L. monocytogenes* e um aumento mais constante a partir da segunda semana, indicando uma rápida adaptação e crescimento do patógeno ao ambiente de refrigeração (10°C) já na 1ª semana de estocagem.

L. monocytogenes é um microrganismo psicrotolerante pela capacidade de desenvolvimento em baixas temperaturas, como as de refrigeração (LIU *et al.*,

2002; SILVA *et al.*, 2007), tornando-se um perigo potencial para os alimentos conservados sob essa condição.

Vários solutos de baixo peso molecular da membrana do patógeno atuam como agentes crioprotetores, estimulando o crescimento de *L. monocytogenes*. Como reação à redução da temperatura, há um incremento da expressão das proteínas bacterianas ao choque térmico como uma espécie de aclimatação, ao contrário de uma resposta de adaptação em longo prazo (LIU *et al.*, 2002).

Quanto a BLN, T0 é diferente estatisticamente de T1 ($p \leq 0,05$), com uma contagem reduzida em T0 e um aumento progressivo logo na primeira semana, sugerindo um efeito inibitório imediato da nisina sobre a contagem de *L. monocytogenes* no momento após a inoculação e uma rápida adaptação ao ambiente de armazenamento logo em seguida. T2 é semelhante estatisticamente a T0, T1 e T4 ($p > 0,05$), continuando um aumento progressivo na contagem de *L. monocytogenes* até a 4ª semana.

Em relação a BLB, T0 é semelhante estatisticamente a T1 ($p > 0,05$) e diferente dos demais tempos ($p \leq 0,05$), T1 por sua vez é semelhante a T2, T4 e T8 ($p > 0,05$). Este resultado sugere um pequeno incremento na contagem de *L. monocytogenes* logo no início até a 1ª semana, tornando-se sutil ao longo do período de armazenamento, que se manteve constante.

Em estudo semelhante, Oliveira (2008) inoculou, em amostras de salsichas irradiadas, armazenadas a 4°C por 60 dias, *L. monocytogenes* e nisina comercial e *L. monocytogenes* e substância inibitória purificada de *Pediococcus acidilactici* (semelhante à bacteriocina – denominada BLIS). Os resultados demonstraram que o tratamento contendo a nisina obteve maior efeito inibitório durante todo o período de armazenamento quando comparado ao controle positivo (somente *L. monocytogenes*). Confrontando-se o tratamento contendo a nisina e o tratamento contendo BLIS, a nisina obteve resultado superior na inibição de *L. monocytogenes* até 30 dias de armazenamento. De 30 a 60 dias, o tratamento contendo BLIS foi superior, demonstrando-se eficiente no controle do desenvolvimento do patógeno.

A Figura 10 representa o comportamento dos tratamentos ao longo do período de armazenamento a partir das médias das contagens de *L. monocytogenes* (log UFC. g⁻¹).

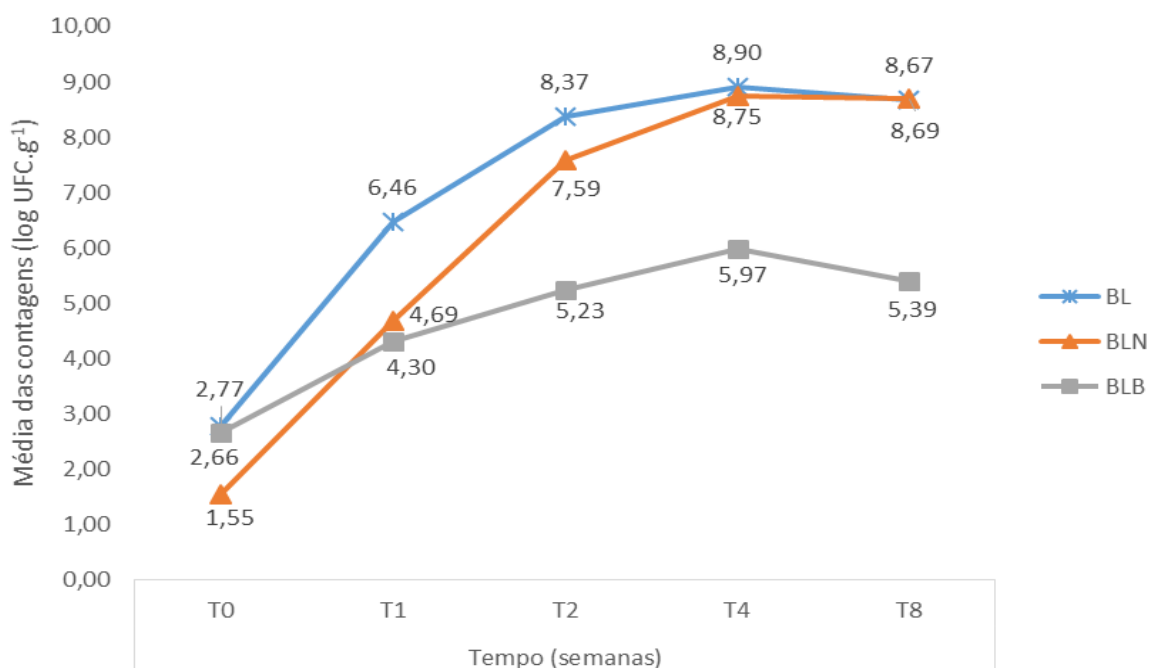


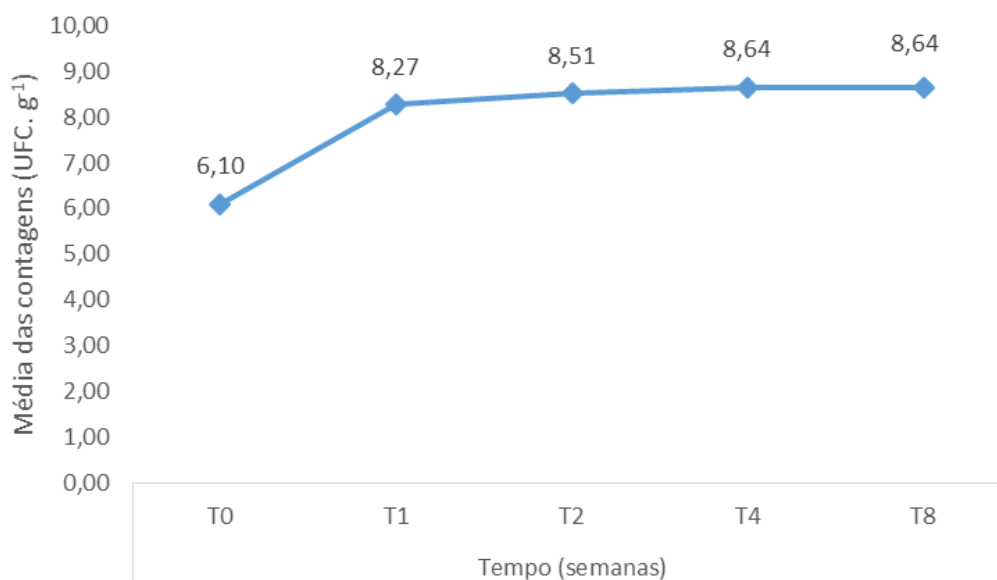
Figura 10 – Comportamento dos tratamentos a partir das médias das contagens de *L. monocytogenes* (log UFC.g⁻¹) ao longo do período de armazenamento

5.2.1.4 Avaliação da viabilidade de *Leuconostoc mesenteroides*

Embora as amostras de salsichas inoculadas com *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 foram consideradas um tratamento, aqui foram abordadas separadamente, pois foi o único tratamento em que não houve inoculação de *L. monocytogenes* 4b e, portanto, não se relacionou com os demais tratamentos, em termos de contagem.

Logo após a inoculação, na 1^a e na 2^a semanas, as contagens apresentaram-se diferentes significativamente ($p \leq 0,05$). Apenas na 2^a, 4^a e 8^a semanas as contagens foram semelhantes estatisticamente ($p > 0,05$). *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 obteve média de contagem de crescimento gradativo desde a inoculação e estabilização a partir da 2^a semana até o final do período de armazenamento.

O desenvolvimento de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 contida no tratamento BB, ao longo do período de armazenamento, apresentado pelas médias das contagens, em log UFC. g⁻¹, é demonstrado na Figura 11.



Figura

11 – Comportamento de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 pelas médias das contagens da BAL (log UFC.g⁻¹) durante o período de armazenamento

Assim, ficam demonstrados tanto a viabilidade da célula avaliada durante toda a estocagem refrigerada quanto os potenciais metabólitos/antimicrobianos produzidos ou outras substâncias inibitórias, indicando que a cepa de BAL selecionada *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 apresentou-se como promissora para a inibição de *L. monocytogenes* 4b em salsichas.

A formação de substâncias produzidas por microrganismos isolados de grãos de kefir é capaz de controlar o crescimento microbiano de patógenos (Dias, 2011), visto que algumas cepas possuem a capacidade de produção de metabólitos secundários com atividade inibitória, como as bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e diacetil, melhorando a conservação (MEDINA e LAINE, 2011).

Para Klaenhammer (1993), o gênero *Leuconostoc* pode produzir substâncias inibitórias, como vários tipos de bacteriocinas com atividade inibitória contra *L. monocytogenes*, exercendo efeito bactericida ou bacteriostático.

Porém, De Martinis, Alves e Franco (2002) afirmaram que o uso de antimicrobianos produzidos por BAL como único método de proteção não é suficiente, e que a utilização de métodos combinados de conservação é o ideal para a garantia da segurança alimentar.

5.2.1.5 Teste de esterilidade das amostras de salsicha

As amostras foram submetidas à radiação a uma taxa de dose de 10 kGy para completa eliminação de uma eventual carga microbiana (deterioradora ou patogênica) existente nessas amostras de salsicha, uma vez que a própria carne, ingredientes e aditivos podem carrear microrganismos naturalmente presentes, e a pasteurização não elimina totalmente a microbiota presente nas salsichas.

Oliveira (2008), em estudo de determinação da dose ideal de irradiação para eliminação da microbiota natural em salsichas, utilizou as doses de 1,25 kGy, 2,5 kGy, 5 kGy e 10 kGy, sendo esta última a dose em que não houve desenvolvimento microbiano nas amostras até 60 dias de armazenamento.

Os resultados das análises confirmaram a esterilidade das amostras de salsicha, uma vez que todas as análises realizadas nos tempos inicial (T0) e final (T8) dos tratamentos, em todas as repetições, obtiveram ausência de crescimento microbiano em ágar MRS, comprovando que a dose de radiação de 10 kGy é eficiente para a esterilidade de salsichas.

Desse modo, o tratamento aplicado eliminou a possibilidade de que a microbiota presente nas amostras interferisse, por competição ou outros mecanismos, nos resultados obtidos neste experimento, quando se confrontou *L. monocytogenes* 4b e *Leuconostoc mesenteroides* 9U2.

6. CONCLUSÕES

O método de seleção *in vitro* é capaz de diferenciar, dentre as cepas de BAL, aquelas que apresentaram maior capacidade inibitória por método direto e indireto frente às diferentes cepas de *L. monocytogenes*.

Nas condições experimentais realizadas, observa-se que *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 é a espécie mais eficiente para inibir cepas de *Listeria monocytogenes* 4b em salsichas.

A irradiação de salsichas com taxa de dose de 10 KGy resultam em esterilidade das amostras por até oito semanas de estocagem refrigerada.

Quando confrontadas, a cepa selecionada de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 apresenta maior atividade inibitória que uma solução de 200 ppm de nisina comercial.

Os resultados obtidos indicam que ocorre um intenso crescimento de *L. monocytogenes* em amostras de salsichas mantidas sob refrigeração (10°C), ultrapassando os limites internacionalmente estabelecidos como aceitáveis para consumo humano.

A cepa de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 e a de *Listeria monocytogenes* 4b mostram-se viáveis em salsichas durante todo o período de armazenamento sob refrigeração, inclusive com aumento das contagens.

Esses resultados sugerem que *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 isolada de grãos de kefir tem potencial promissor para apresentar efeito antagonista frente às cepas de *L. monocytogenes* 4b em salsichas, devido à capacidade de produção de substâncias inibitórias (similares a bacteriocinas).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASLYNG, M. D.; VESTERGAARD, C.; KOCH, A. G. The effect of salt reduction on sensory quality and microbial growth in hotdog sausages, bacon, ham and salami. **Meat Science**, n. 96, p. 47-55, 2014.

ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. **Relatório anual da carne suína brasileira**. 2009/2010. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2009_pt.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2015.

ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. **Relatório anual da carne suína brasileira**. 2012/2013. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2012_pt.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2015.

ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 169-185, 1995.

ADAMS, M. R. Safety of industrial lactic acid bacteria. **Journal of Biotechnology**, v. 68, n.2, p. 171-178, 1999.

AGUILAR, C.; KLOTZ, B. Effect of the temperature on the antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Safety**, v. 30, p. 996–1015, 2010.

ALTAY, F.; KARBANCIÖGLU-GÜLER, F., DASKAYA-DIKMEN, C.; HEPERKAN, D. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. **International Journal of Food Microbiology**, n. 167, p. 44–56, 2013.

ALSAYADI, M.; AL JAWFI, Y.; BELARBI, M.; SABRI, F. ANTIOXIDANT POTENCY OF WATER KEFIR. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 02, n. 06, p. 2444-2447, 2013.

AUAD, L. I. **Seleção de bactérias lácticas do kefir como produtoras de substâncias inibitórias de *Listeria monocytogenes***. 2014. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade

Federal de Minas, Belo Horizonte, 2014.

BARROS, J. R.; KUNIGK, L.; JURKIEWICZ, C. H. Incorporation of nisin in natural casing for the control of spoilage microorganisms in vacuum packaged sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 41, p. 1001-1008, 2010.

BATTISTELLA, P. M. D. **Análise de sobrevivência aplicada à estimativa da vida de prateleira de salsicha**. 2008. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

BERTSCH, D.; RAU, J.; EUGSTER, M. R.; HAUG, M. C.; LAWSON, P. A.; LACROIX, C.; MEILE, L. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 63, p. 526-532, 2013.

BORCH, E.; KANT-MUEMANS, M.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p 103-120, 1996.

BOTSARIS, G.; TAKI, A. Effect of high-pressure processing on the microbial quality throughout the shelf life of vacuum-packed sliced ham and frankfurters. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6 p. 840–845, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento Técnico-Normativo - DETEN da Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria DETEN/MS nº 29, de 22/01/1996**. Aprova a extensão de uso da NISINA com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5mg/kg. Diário Oficial da União, Brasília, 22 jan. 1996. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d7b1f68045a94e339c0d9fa9166895f7/Portaria+n+29+de+22+de+janeiro+de+1996.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 08 abr. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal SDA/DIPOA. Produtos Químicos e Biológicos/Autorização de uso nos estabelecimentos sob SIF. **Ofício: AUP/DOI/DIPOA nº 563/98**. Brasília, 19/11/1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada. **RDC nº 23, de 15/03/2000 a**. Aprova o regulamento técnico sobre o manual de procedimentos básicos para registro e dispensa da obrigatoriedade de registro de produtos pertinentes à área de alimentos. Revoga a Portaria SVS/MS nº

120, de 18 de fevereiro de 1999. Diário Oficial da União, Brasília, 15 mar. 2000.

Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/areas/coges/legislacao/2000/RDC_23_2000.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 4, de 31/03/2000 b.** Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. Diário Oficial da União, Brasília, 5 mar. 2000. Disponível em:

<[http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7778)

[consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7778](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7778)>. Acesso em: 01 jun. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada. **RDC nº 12, de 02/01/2001.** Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, 10 jan. 2001. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 16 abr. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003.** Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília, 18 set. 2003. Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/animal/laboratorios/publicacoes>>. Acesso em 22 abr. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 46, de 23/10/2007.** Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial da União, Brasília, 23 out. 2007. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em 27 out. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 9, de 08/04/2009.** Instituir os procedimentos de controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo. Diário Oficial da União, Brasília, 9 abr. 2009. Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/animal/dipoa/dipoa-pncp/listeria>>. Acesso em: 20 abr. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada. **RDC nº 27, DE 06/08/2010.** Dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário. Revoga o item 8.2 do Anexo da Resolução 23, de 15 de março de 2000 e a Resolução da Diretoria

Colegiada da ANVISA - RDC nº 278, de 22 de setembro de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, 06 ago. 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b951e200474592159a81de3fbc4c6735/DIRETORIA_COLEGIADA_27_2010.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 08 abr. 2015.

BRASIL. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Norma Interna DIPOA/SDA Nº 01, de 09/08/2013**. Aprova os procedimentos operacionais complementares à Instrução Normativa nº 09, de 8 de abril de 2009, definindo os procedimentos para a coleta oficial de amostras para o controle de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo a serem adotados pelo Serviço de Inspeção Federal, na forma dos Anexos à presente Norma. Brasília, 09 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/animal/dipoa/dipoa-pncp/listeria>>. Acesso em: 20 abr. 2015.

CAMPOS, N. S.; OLIVEIRA, K. S.; ALMEIDA, M. R.; STEPHANI, R.; OLIVEIRA, L. F. C. Classification of frankfurters by FT-Raman spectroscopy and chemometric methods. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 18980-18992, 2014.

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

CARASI, P.; JACQUOT C.; ROMANIN, D. E.; ELIE, A.-M.; ANTONI, G. L.; URDACI, M. C.; SERRADELL, M. A. Safety and potential beneficial properties of *Enterococcus* strains isolated from kefir. **International Dairy Journal**, v. 39, p.193-200, 2014.

CESAR, A. P. R.; DE MESQUITA, A. J.; PRADO, C. S.; NUNES, I. A.; DE ALMEIDA FILHO, E. S. A. *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* na produção de salsichas tipo hot dog. **Ciência Animal Brasileira**. v. 12, n. 2, p. 339-352, 2011.

CINTAS, I.; MIGUEL, L.1995. **Caracterización bioquímica y genética parcial de la pediocina L50, una nueva bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* L50 aislado de embutidos crudos curados**. 1995. Tese de Doutorado. Universidade Autónoma de Madri. Spain, 1995.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, v. 18, n, 2 e 3, p. 191-208, 2002.

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

DEN BAKKER, H. C.; MANUEL, C. S.; FORTES, E. D.; WIEDMANN, M.; NIGHTINGALE, K. K. Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii subsp. coloradonensis subsp. nov.*, a novel *Listeria fleischmannii subspecies* isolated from a ranch. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 09, p. 3257-3268, 2013.

DEN BAKKER, H. C.; WARCHOCKI, S.; WRIGHT, E. M.; ALLRED, A. F.; AHLSTROM, C.; MANUEL, C. S.; STASIEWICZ, M. J.; BURRELL, A.; ROOF, S.; STRAWN, L. K.; FORTES, E.; NIGHTINGALE, K. K.; KEPHART, D.; WIEDMANN, M. *Listeria floridensis sp. nov.*, *Listeria aquatica sp. nov.*, *Listeria cornellensis sp. nov.*, *Listeria riparia sp. nov.* and *Listeria grandensis sp. nov.*, from agricultural and natural environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 1882-1889, 2014.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin as food preservative. **Food Aust.**, v. 57 p. 525- 52, 2005.

DESTRO, M. T.; MELO SERRANO, A.; KABUKI, D. Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**. v. 02, p. 110-112, 1991.

DEVLIEGHIERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**. v. 14, p. 273-285, 2004.

DI RIENZO, J. A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M. G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C. W. **InfoStat**, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2008.

DIAS, P. A. **Atividade antimicrobiana de microrganismos presentes em grãos de kefir**. 2011. 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Veterinária Preventiva) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2011.

EFSA - European Food Safety Authority. **Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates**. Parma, Italy: EFSA Journal, v. 11, n. 6, 2013, 75 p. Disponível em:

<<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3241.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2014.

EFSA/ECDC - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. **The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012:** Scientific Report of EFSA and ECDC. Parma, Italy: EFSA Journal, v. 12, n. 2, 2014, 312 p. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3547.pdf>>. Acesso em: 02 mar. 2015.

ENNARHAR, C.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 85-106, 2000.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal of Systematic Bacteriological**, 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/listeria.html>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

FARNWORTH, E. R. Kefir – a complex probiotic. **Food Science and Technology Bulletin: Functional foods**, v. 2, n. 1, p. 1–17, 2005.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria:** report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Córdoba, Argentina, 2001. Rome: FAO: World Health Organization, 34p. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2015.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. **"Codex Alimentarius: Milk and Milk Products"**, 2ª ed. Rome, Italy, 2011. 248 p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/Booklets/Milk/Milk_2011_EN.pdf>. Acesso em: 23 fev. 2015.

FELDMANN, V. **Avaliação de linhagens bacterianas obtidas a partir do kefir como cultura iniciadora para produção de embutido cárneo fermentado.** 2015. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte, 2015.

FERRACCIOLI, V. R. **Avaliação da qualidade de salsichas do tipo *hot dog* durante o armazenamento.** 2012. 116 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de

Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Engenharia Mauá, do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2012.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p 51–70, 2007.

GADANG, V.P.; HETTIARACHCHY, N.S.; JOHNSON, M.G.; OWENS, C. Evaluation of Antibacterial Activity of Whey Protein Isolate Coating Incorporated with Nisin, Grape Seed Extract, Malic Acid, and EDTA on a Turkey Frankfurter System. **Journal of food science**, M: Food Microbiology and Safety, v.73, n. 8, 2008.

GARRITY, G. M.; LILBURN, T. G.; COLE, J. R.; HARRISON, S. H.; EUZÉBY, J.; TINDALL, B. J. **Taxonomic outline of the Bacteria and Archaea**, Part 9 – The *Bacteria*: Phylum “*Firmicutes*: Class “*Bacilli*”. State University, Board of Trustees, 2001-2007, Release 7.7, 2007. Disponível em: <
<http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

GRAVES, L. M.; HELSEL, L. O.; STEIGERWALT, A. G.; MOREY, R. E.; DANESHVAR, M. I.; ROOF, S. E.; ORSI, R. H.; FORTES, E. D.; MILILLO, S. R.; DEN BAKKER, H. C.; WIEDMANN, M.; SWAMINATHAN, B.; SAUDERS, B. D. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 60, p. 1280–1288, 2010.

GUERRA, N. P.; MACÍAS, C. L.; AGRASAR, A. T.; CASTRO, L. P. Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin® as biopreservative agent. **The Society for Applied Microbiology**, Letters in Applied Microbiology, n. 40, p. 106-110, 2005.

HAMPIKYAN H.; UGUR, M. The effect of nisin on *L. monocytogenes* in Turkish fermented sausages (sucuks). **Meat Science**, n. 76, p. 327-332, 2007.

HARTMANN, H. A.; WILKE, T.; ERDMANN, R. Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 192–199, 2011.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in foods 7: Microbiological testing in food safety management**. New York: Springer, 2002. 362 p.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia. **Salsicha em Lata Tipo Viena, Carne Seca (Charque) e Jerked Beef**. 1998. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/salsicha.asp>>. Acesso em 02 set. 2013.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p 39-86, 1993.

KO, S.; JANES, M.E.; HETTIARACHCHY, N.S.; JOHNSON, M. G. Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 7, 2001.

KRUGER, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça frescal refrigerada através de óleo essencial de orégano e nisina**. 2006. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

LANG HALTER, E.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 63, p. 641-647, 2013.

LAUREYS D.; DE VUYST, L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2564-2572, 2014.

LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P. A. D.; LE FLÈCHE-MATÉOS, A.; ROCHE, S. M.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; LE MONNIER, A.; LECUIT, M.; ALLERBERGER, F. *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 60, p. 2210-2214, 2010.

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, n. 13, p. 145-150, 1991.

LEITE, A. M. O.; MIGUEL, M. A. L.; PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 341-349, 2013.

LIN, Y. T.; LABBE, R. G.; SHETTY, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. **Applied and Environmental Microbiology**, American Society for Microbiology, v. 70, n. 9, p. 5672–5678, 2004.

LINKE, K.; RÜCKERL, I.; BRUGGER, K.; KARPISKOVA, R.; WALLAND, J.; MURIKLINGER, S.; TICHY, A.; WAGNER, M.; STESSL, B. Reservoirs of *Listeria* species in three environmental ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 18, p. 5583-5592, 2014.

LIU, S.; GRAHAM, J. E.; BIGELOW, L.; MORSE II, P. D.; WILKINSON, B. J. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, American Society for Microbiology, v. 68, n. 4, p. 1697–1705, 2002.

LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micología**, n. 23, p. 67-74, 2006.

LÜCKE, F-K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v. 56, p. 105-115, 2000.

MARTINEZ, R. C. R.; DE MARTINIS, E. C. P. Effect of *Leuconostoc mesenteroides* 11 bacteriocin in the multiplication control of *Listeria monocytogenes* 4b. **Food Science and Technology**, Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, n.1, p 52-55, 2006.

MEDINA, D. A.; LAINE, A. M. Food Quality: control, analysis and consumer concerns. In: MARCÓ, M. B.; REINHEIMER, J.; QUIBERONI, A. **Characterization of phage receptors in Lactic Acid Bacteria**. Food Science and Technology, New York: Nova Science Publishers, Inc., p. 431-442, 2011.

MELO, N. R.; SOARES, N. F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 303, n. 52, p. 921-938, 2005.

MORGAN, S. M.; GALVIN, M.; ROSS, R.P.; HILL, C. Evaluation of a spray-dried *lacticin* 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 387–391, 2001.

NAAS, H.; MARTINEZ-DAWSON, R.; HAN, I.; DAWSON, P. Effect of combining nisin with modified atmosphere packaging on inhibition of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat turkey bologna. **Poultry Science**, n. 92, p. 1930–1935, 2013.

NEETOO, H.; YE, M.; CHEN, H.; JOERGER, R. D.; HICKS, D. T.; HOOVER, D. G. Use of nisin-coated plastic films to control *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged cold-smoked salmon. **International Journal of Food Microbiology**, n. 122, p. 8-15, 2008.

NIELSEN, B.; GÜRAKAN G. C.; ÜNLÜ G. Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy. **Product. Probiotics & Antimicro. Prot.**, n. 6, p. 123-135, 2014.

NOORDHOUT, C. M.; DEVLEESSCHAUWER, B.; ANGULO, F. J.; VERBEKE, G.; HAAGSMA, J.; KIRK, M.; HAVELAAR, A.; SPEYBROECK, N. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, p. 1073–1082, 2014.

OLIVEIRA, R. B. P. **Produção e purificação parcial de substâncias semelhantes a bacteriocinas com atividade contra *Listeria monocytogenes*, in vitro e em salsichas**. 2008. 91 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte, 2008.

PAIVA, I. M. **Caracterização estrutural e avaliação da capacidade imunomodulatória de exopolissacarídeos produzidos por *lactobacilos* isolados de kefir**. 2013. 91 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte, 2013.

PETTINATI, N. N.; TELLES, E. O.; BALLIAN, S. C. *Listeria monocytogenes* in hot dog sausages obtained from groceries stores in the city of São Paulo – a comparative and retrospective analysis of human listeriosis isolates. **Veterinária e Zootecnia**. v. 13, n. 2, p. 182-191, 2006.

RÉCHARD, Y.; DÉRIJARD, J.; LETELLIER, F.; CENATIEMPO, Y. Characterization and purification of mesentericin Y 105, an anti-listeria bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of General Microbiology**, n. 138, p. 2725-2731, 1992.

REUNANEN, J.; SARIS, P.E.J. Bioassay for nisin in sausage; a shelf life study of nisin in cooked sausage. **Meat Science**, n. 66, p. 515–518, 2004.

RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J. M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 25, p. 404-408, 2005.

ROSA, C. M. **Purificação e mecanismo de ação de uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2^a isolado de linguiça frescal**. 2001. 98 p. Tese (Doutorado em Ciência Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SANTOS, A.; SAN MAURO, M.; SANCHEZ, A.; TORRES, J. M.; MARQUINA, D. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus spp.* isolated from kefir. **Systematic Applied Microbiology**, n. 26, p. 434-437, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2007, 536 p.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p.123-138, 2008.

THEIVENDRAN, S.; HETTIARACHCHY, N. S.; JOHNSON, M. G. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin combined with grape seed extract or green tea extract in soy protein film coated on turkey frankfurters. **Journal of food science**, M: Food Microbiology and Safety, v.71, n. 2, 2006.

USDA FSIS (U.S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service). ***Listeria monocytogenes* regulations** - Inspection Methods. 39 p. 2015. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/c71a37e9-1fc5-49b8-b7d6-48c67375124f/39_IM_Lm_Regs.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15 jul. 2015.

WALLACE, F. M.; CALL, J. E.; PORTO, A. C. S.; COCOMA, G. J.; LUCHANSKY, J. B. Recovery rate of *Listeria monocytogenes* from commercially prepared frankfurters during extended refrigerated storage. **Journal of food protection**, v. 66, n. 4, p. 584-591, 2003.

VAZ-VELHO, M.; JÁCOME S.; NORONHA, L.; TODOROV, S.; FONSECA, S.; PINHEIRO, R.; MORAIS, A.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. Comparison of antilisterial effects of two strains of lactic acid bacteria during processing and storage of a portuguese salami-like product “alheira”. **Chemical Engineering Transactions**. v. 32, p. 1807-1812, 2013.

VINDEROLA, C. G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGÓ, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. **Journal of Dairy Research**, n. 72, p. 195-202, 2005.

ZANIRATI, D. F. **Caracterização de bactérias lácticas da microbiota de grãos de kefir cultivados em leite ou água com açúcar mascavo por metodologias dependentes e independentes de cultivo**. 2012. 87 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

ZDANSKI, S. F. R. **Ácidos orgânicos e seus sais e nisina no controle de bactérias lácticas, aeróbias mesófilas e *Listeria monocytogenes* em salsichas**. 2011. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.