

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

LÍGIA ISONI AUAD

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS DO KEFIR COMO PRODUTORAS DE
SUBSTÂNCIAS INIBITÓRIAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Belo Horizonte - MG
2014

LÍGIA ISONI AUAD

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS DO KEFIR COMO PRODUTORAS DE
SUBSTÂNCIAS INIBITÓRIAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

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 de título de Mestre em Ciências de Alimentos.

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientadora: Dr^a. Roseane Batitucci Passos de Oliveira

Coorientadora: Dr^a. Elisabeth Neumann

Belo Horizonte - MG
2014

A887s Auad, Lígia Isoni.
Seleção de bactérias lácticas do kefir como produtoras de substâncias inibitórias de *Listeria monocytogenes* / Lígia Isoni Auad. – 2014.
111f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Roseane Batitucci Passos de Oliveira.
Coorientadora: Profa. Dra. Elisabeth Neumann.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Probióticos – Teses. 2. Kefir – Teses. 3. Leite fermentado – Teses. 4. Bactérias produtoras de ácido láctico – Teses. 5. Alimentos – Teses. I. Oliveira, Roseane Batitucci Passos de. II. Neumann, Elisabeth. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD 637.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS -PPGCA

LÍGIA ISONI AUAD

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS DO KEFIR COMO
PRODUTORAS DE SUBSTÂNCIAS INIBITÓRIAS DE
*LISTERIA MONOCYTOGENES***

APROVADA EM 10 DE JULHO DE 2014

COMISSÃO EXAMINADORA


Prof. Dr. AFONSO DE LIGUORI OLIVEIRA


Prof. Dr. MARCELO RESENDE DE SOUZA


Profa. Dra. ROSEANE BATITUCCI PASSOS DE OLIVEIRA
(Orientadora e Presidente da Comissão)

*Dedico este trabalho aos meus três grandes
companheiros.*

AGRADECIMENTOS

À vida, dádiva tão abençoada, sem a qual nada seria possível.

Aos meus pais, João Batista Auad e Cristina Maria Isoni Auad, pelo carinho, suporte e minha existência.

Ao amor da minha vida, Bruno Franco Correa, por existir. Você é meu mentor, grande amigo, companheiro e exemplo de vida. É impossível expressar com palavras o sentimento que tenho por você, um espírito de luz e a melhor coisa que aconteceu em minha vida. Meu amor por você é infinito.

Ao Lassie, meu amigão de quatro patas, por ter tornado minha fantasia de infância realidade. Todos esses anos que passamos juntos foram mágicos, cheios de muito amor. Em nosso primeiro encontro, em que ambos éramos pequeninos, tive a certeza de que, naquele momento, iniciava-se uma grande aventura, na qual os laços se tornariam eternos. O físico, agora, é só um detalhe, pois você continua mudando minha vida.

Ao Netuno, o mais novo membro da matilha. Sou eternamente grata pelo nosso encontro inesperado, o qual me ofereceu a oportunidade de salvar sua vida. Você é a prova de que nada é por acaso. Apesar do pouco tempo de convivência, com esse jeito estabonado e completamente maluco, você já faz parte da família e tem um cantinho especial no meu coração.

À professora Roseane Batitucci Passos de Oliveira, pela presença, paciência e conhecimentos.

À professora Elisabeth Neumann, pelo acolhimento e fornecimento das cepas de bactérias láticas.

Ao professor Afonso de Liguori Oliveira, pelo fornecimento de recursos e auxílio.

Ao professor Marcelo Resende de Souza, pela participação na banca de defesa e sugestões.

Às colegas de laboratório Murielle Ferreira de Moraes e Vanessa Feldmann, pela companhia divertida e auxílio em momentos de sucesso e insucesso.

À Luiza de Alcântara Moraes, pela disponibilidade e momentos de reflexão.

Aos professores, funcionários e colegas do MICROAL e LAMIB, pelo trabalho diário.

Aos professores, funcionários e colegas do LEFM, pela atenção e solicitude.

À Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFMG), pelo auxílio financeiro ao projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

À Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), pelo trabalho eficiente e fornecimento de cepas de *Listeria monocytogenes*.

A todos os professores, funcionários e colegas da Faculdade de Farmácia e do curso de Nutrição que contribuíram, com incentivo e suporte, para meu ingresso e desenvolvimento na pós graduação.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para minha formação como cientista e ser humano.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.
(Marcel Proust)*

RESUMO

Kefir é um leite fermentado que contém uma mistura de microrganismos, principalmente bactérias lácticas (BAL). Esses microrganismos podem ser uma estratégia útil e eficaz para prevenir ou reduzir a incidência de patógenos e, assim, garantir a inocuidade de alimentos e a saúde de consumidores. A partir de grãos de kefir, foram isoladas cepas de BAL que, após identificação por PCR, foram avaliadas quanto à sua atividade inibitória contra quatro cepas de *Listeria monocytogenes*. As cepas utilizadas (n=24), pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, foram testadas de forma recíproca pelo método *spot-on-lawn*, sendo *Lactobacillus satsumensis* 18P a cepa mais sensível. Foram, então, identificadas as 12 cepas de BAL que apresentaram a maior atividade inibitória frente às demais. Dessas, foram obtidos sobrenadantes filtrados (SF) e sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) após cultivo em MRS caldo. Esses sobrenadantes foram avaliados, pelo método de difusão em poços e em placas de microtitulação, quanto à atividade e capacidade inibitória frente às cepas de *Listeria monocytogenes*. Não foi observada inibição de crescimento de *Listeria monocytogenes* pelos SF e SNF testados pelo método de difusão em ágar. Entretanto, no teste de placas de microtitulação, foi observada inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* por até 30 horas de incubação. Os SF e SNF que apresentaram melhores efeitos antagonistas foram provenientes de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2. Dessa forma, pode-se concluir que as cepas de BAL isoladas de kefir são produtoras de substâncias inibitórias de *Listeria monocytogenes*. Esses resultados são promissores, pois os sobrenadantes testados apresentaram tal capacidade em sua forma bruta. Estudos futuros deverão investigar a possibilidade de se obter concentrados dessas substâncias com maior potencial inibitório e possibilidade de uso em alimentos para garantir inocuidade.

Palavras-chave: bactérias lácticas, *Listeria monocytogenes*, kefir, substâncias inibitórias

ABSTRACT

Kefir is a sour fermented milk that contains a mixture of microorganisms, mainly lactic acid bacteria (LAB). LAB may be a useful and effective strategy to prevent or reduce the incidence of pathogens, thus improving food safety and consumer health. Strains of LAB isolated from kefir grains and identified by PCR were evaluated for their inhibitory activity against four strains of *Listeria monocytogenes*. The strains (n = 24) belonging to the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Leuconostoc* were reciprocally tested by spot-on-lawn method and *Lactobacillus satsumensis* 18P was selected as the most sensitive strain. Twelve LAB strains that showed the highest inhibitory activity were then selected from which were obtained cell free supernatants (CFS) and cell free neutralized supernatants (CFNS) after cultivation in MRS broth. These supernatants were evaluated for their activity and inhibitory effect against strains of *Listeria monocytogenes* by the well diffusion and microtiter plates assays. CFS and CFNS tested by well diffusion assay showed no inhibition against *Listeria monocytogenes*. However, in the microtiter plate assay, growth inhibition of *Listeria monocytogenes* until 30 hours of incubation could be observed. From the CFS and CFNS tested, *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 presented the best antagonistic effects. Thus, it can be concluded that the strains of LAB isolated from kefir have the ability of producing substances that are capable of inhibiting *Listeria monocytogenes*. These results are promising, since the supernatants tested showed such capacity in its crude form. Future studies should investigate the possibility of obtaining concentrates of these substances with the highest inhibitory potential and possible use in foods to ensure safety.

Keywords: lactic acid bacteria, *Listeria monocytogenes*, kefir, inhibitory substances

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cepas de bactérias lácticas (BAL) utilizadas neste estudo.....	49
Tabela 2: Cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> utilizadas neste estudo.....	49
Tabela 3: Valores médios das medidas de halos de inibição (em mm) de cepas de bactérias lácticas em teste de atividade inibitória direta por método <i>spot-on-lawn</i> contra <i>Lactobacillus casei</i> 17U e <i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P	56
Tabela 4: Resultado qualitativo de atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) e sobrenadantes filtrados (SF) em teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços contra <i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P	59
Tabela 5: Valores de pH de sobrenadantes filtrados e valores de pH de sobrenadantes neutralizados filtrados obtidos de cepas de bactérias lácticas	60
Tabela 6: Valores médios de absorbância para atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) por período de incubação contra cepa de <i>Listeria monocytogenes</i> isolada de salsicha em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação	68
Tabela 7: Valores médios de absorbância para atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) por período de incubação contra cepa de <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação	70
Tabela 8: Valores médios de absorbância para atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) por período de incubação contra cepa de <i>Listeria monocytogenes</i> 4a em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação	72
Tabela 9: Valores médios de absorbância para atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) por período de incubação contra cepa de <i>Listeria monocytogenes</i> 4b em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação	74
Tabela 10: Valores médios de absorbância para atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) por período de incubação contra cepa de <i>Listeria monocytogenes</i> isolada de salsicha em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.....	77
Tabela 11: Valores médios de absorbância para atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) por período de incubação contra cepa de <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação	79
Tabela 12: Valores médios de absorbância para atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) por período de incubação contra cepa de <i>Listeria monocytogenes</i> 4a em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação	81
Tabela 13: Valores médios de absorbância para atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) por período de incubação contra cepa de <i>Listeria monocytogenes</i> 4b em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Atividade antimicrobiana de cepas de bactérias láticas contra <i>Lactobacillus casei</i> 17U em teste de atividade inibitória direta por método <i>spot-on-lawn</i>	56
Figura 2: Atividade antimicrobiana de cepas de bactérias láticas contra <i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P em teste de atividade inibitória direta por método <i>spot-on-lawn</i>	56
Figura 3: Atividade antimicrobiana de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) em teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços contra <i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P.	59
Figura 4: Atividade antimicrobiana de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) em teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços contra <i>Listeria monocytogenes</i> isolada de salsicha.	63
Figura 5: Curva de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> isolada de salsicha e atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.	69
Figura 6: Curva de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a e atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.	71
Figura 7: Curva de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> 4a e atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.	73
Figura 8: Curva de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> 4b e atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.	75
Figura 9: Curva de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> isolada de salsicha e atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.	78
Figura 10: Curva de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a e atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.	80
Figura 11: Curva de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> 4a e atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.	82
Figura 12: Curva de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> 4b e atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC:	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BAL:	Bactérias Láticas
BPF:	Boas Práticas de Fabricação
CDC:	Centre of Disease Control (Centro de Controle de Enfermidades)
DTA:	Doença Transmitida por Alimentos
FAFAR:	Faculdade de Farmácia
FAO:	Food and Agriculture Organization (Organização de Agricultura e Alimentação)
GRAS:	Generally Recognized As Safe (Geralmente reconhecido como seguro)
ICB:	Instituto de Ciências Biológicas
IDF:	International Dairy Federation (Federação Internacional de Lácteos)
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
KLCU:	Kefir de Leite de Curitiba
KLDI:	Kefir de Leite de Divinópolis
KLSA:	Kefir de Leite de Salvador
KLVI:	Kefir de Leite de Viçosa
LAB:	Lactic acid bacteria (Bactérias lácticas)
LEFM:	Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos
LGMPP:	Laboratório de Genética Molecular de Protozoários e Parasitas
MICROAL:	Laboratório de Microbiologia de Alimentos
SF:	Sobrenadante Filtrado
SNF:	Sobrenadante Neutralizado Filtrado
UFC:	Unidades Formadoras de Colônias
UFMG:	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO:	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivos específicos	17
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1. Bactérias lácticas (BAL).....	18
3.1.1. Gênero <i>Lactobacillus</i>	19
3.1.1.1. <i>Lactobacillus casei</i>	20
3.1.1.2. <i>Lactobacillus kefir</i>	21
3.1.1.3. <i>Lactobacillus diolivorans</i>	21
3.1.1.4. <i>Lactobacillus perolens</i>	21
3.1.1.5. <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	22
3.1.1.6. <i>Lactobacillus mali</i>	22
3.1.1.7. <i>Lactobacillus satsumensis</i>	23
3.1.2. Gênero <i>Lactococcus</i>	23
3.1.3. Gênero <i>Leuconostoc</i>	24
3.1.4. Bactérias lácticas como probióticos e utilização na indústria de alimentos	25
3.2. Bacteriocinas	27
3.2.1. Definição e caracterização	27
3.2.2. Propriedades físico-químicas	28
3.2.3. Espectro de atividade	29
3.2.4. Utilização de bactérias lácticas e bacteriocinas em alimentos	30
3.3. Kefir	32
3.3.1. Ação probiótica de microrganismos de kefir	34
3.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	37
3.4.1. Listeriose	39
3.4.2. Contaminação de alimentos e ambientes de processamento por <i>Listeria monocytogenes</i>	43
3.4.3. Medidas de controle para ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos.....	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1. Material	48
4.1.1. Cepas de bactérias lácticas	48
4.1.2. Cepas indicadoras.....	48
4.2. Métodos.....	49
4.2.1. Ativação e manutenção das culturas bacterianas	49
4.2.1.1. Nisina comercial.....	50
4.2.2. Teste de atividade inibitória direta por método <i>spot-on-lawn</i>	51
4.2.3. Obtenção de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) e de sobrenadantes filtrados (SF)	51
4.2.4. Teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços contra cepa de bactéria láctica reveladora.....	52
4.2.5. Inibição de <i>Listeria monocytogenes</i> por sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) e sobrenadantes filtrados (SF)	53
4.2.5.1. Teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços	53
4.2.5.2. Teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação	53
4.2.6. Análise de Dados	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1. Teste de atividade inibitória direta por método <i>spot-on-lawn</i> contra cepas de bactérias lácticas	55

5.2.	Teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços contra cepa de bactéria láctica reveladora <i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P	58
5.3.	Inibição de <i>Listeria monocytogenes</i> por sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) e por sobrenadantes filtrados (SF)	63
5.3.1.	Teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços	63
5.3.2.	Teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.....	65
6.	CONCLUSÃO.....	88
7.	REFERÊNCIAS	89
8.	APÊNDICES	108
	APÊNDICE A - Classificação de bacteriocinas de bactérias lácticas (BAL)	108
	APÊNDICE B - Principais surtos globais de listeriose, 1979-2011.....	109
9.	ANEXOS	110
	ANEXO A - Padrões físico-químicos e microbiológicos do kefir.....	110
	ANEXO B - Valores nutricionais do kefir	111

1. INTRODUÇÃO

A inocuidade de alimentos é um tema de extrema relevância, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Atualmente, o uso de aditivos em alimentos é necessário para garantia de maior vida útil, melhora de características sensoriais e proteção contra microrganismos. No entanto, a coexistência deste fato com a crescente demanda por alimentos industrializados de conveniência, frescos, ricos em vitaminas e nutrientes, saborosos, seguros e, sobretudo, que não constituam risco à saúde, representa um dos maiores desafios para a indústria alimentícia.

Apesar dos recentes avanços científicos, a extensão dos aspectos microbiológicos ainda é a questão mais relevante em inocuidade de alimentos. O aumento significativo da incidência de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) está relacionado a bactérias patogênicas, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*.

Listeria monocytogenes é um dos mais importantes agentes causadores de surtos de infecção alimentar. O controle deste patógeno é um dos desafios que a indústria de alimentos enfrenta, pois *Listeria monocytogenes* se distribui de forma ubíqua, resiste a baixos valores de pH e altas concentrações de cloreto de sódio; consegue sobreviver por longos períodos em ambientes de processamento de alimentos, com formação de biofilmes, além de ser capaz de se multiplicar sob temperaturas de refrigeração.

Com o intuito de apresentar uma possível solução para os diversos surtos de intoxicação e infecção, a indústria tem buscado desenvolver inovações tecnológicas com potencial para implementação na cadeia produtiva. Nesse sentido, a aplicação de bactérias lácticas (BAL) e/ou de seus metabólitos em alimentos, de forma a contribuir para a melhoria de suas características sensoriais, nutricionais e de saúde e, em maior nível, garantir sua inocuidade, pode constituir uma alternativa adequada para a resolução deste impasse. Bactérias consideradas como GRAS (*Generally Recognised As Safe*) são amplamente utilizadas na indústria de alimentos para garantir segurança, preservar qualidade, desenvolver novas características sensoriais e melhorar qualidade nutricional dos alimentos. Além disso, demonstram forte atividade antagonista contra muitos microrganismos de nichos ecológicos similares ou não. Tal atividade deve-se, principalmente, a baixos valores de pH do alimento, competição por nutrientes e produção de metabólitos inibitórios.

Dentre as substâncias de caráter inibitório produzida pelas BAL, as bacteriocinas têm atraído a atenção durante as últimas décadas devido ao potencial dessas substâncias ou de suas cepas produtoras atuarem como bioconservadores. As bacteriocinas e suas BAL

produtoras têm sido utilizadas, principalmente, na preservação e segurança de alimentos, separadamente ou em combinação com outros tratamentos convencionais, como parte da tecnologia de obstáculos.

BAL produtoras de bacteriocinas com atividade antimicrobiana são, em geral, obtidas de alimentos dotados de microrganismos com ação probiótica, como leites fermentados, incluindo o kefir. Essa bebida é obtida pela fermentação do leite com grãos de kefir.

São escassos os estudos a respeito de cepas de BAL isoladas de kefir com potencial de produção de bacteriocinas. Portanto, este trabalho propõe a busca por BAL de kefir produtoras de substâncias inibitórias de *Listeria monocytogenes*.

2. OBJETIVOS

Selecionar cepas de bactérias lácticas (BAL) isoladas de grãos de kefir com atividade inibitória frente à *Listeria monocytogenes*.

2.1. Objetivos específicos

- i. Testar a atividade inibitória das 24 cepas de BAL isoladas de grãos de kefir, de forma recíproca, por atividade inibitória direta por método *spot-on-lawn*;
- ii. A partir dos resultados obtidos no teste de atividade inibitória direta por método *spot-on-lawn*, selecionar a cepa de BAL mais sensível às outras cepas de BAL como reveladora para os testes posteriores;
- iii. Obter sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) e sobrenadantes filtrados (SF) das cepas de BAL que apresentarem atividade inibitória no teste de atividade inibitória direta por método *spot-on-lawn*;
- iv. Testar a atividade inibitória de SNF, SF e nisina por atividade inibitória indireta por método de difusão em poços contra as cepas de BAL;
- v. Testar a atividade inibitória de SNF, SF e nisina por atividade inibitória indireta por método de difusão em poços contra cepas de *Listeria monocytogenes*; e
- vi. Testar a atividade inibitória de SNF, SF e nisina por atividade inibitória indireta em placas de microtitulação contra cepas de *Listeria monocytogenes*, de modo a avaliar os efeitos de SNF e SF ao longo do tempo e em relação à nisina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Bactérias lácticas (BAL)

As BAL compreendem um amplo grupo de microrganismos relativamente próximos sob o ponto de vista filogenético, que compartilham de características fisiológicas, morfológicas e metabólicas similares (AXELSSON, 2004).

De modo geral, as BAL apresentam-se sob a forma de cocos ou bacilos imóveis, não esporulados, Gram-positivo e catalase-negativo, que crescem, preferencialmente, sob condições de microaerofilia a anaerobiose estrita, apesar de poderem se desenvolver em presença de oxigênio (ALI, 2010; KHALID, 2011).

A inabilidade desses microrganismos em sintetizar componentes da cadeia respiratória, como citocromos e porfirinas, impede a geração de ATP por via aeróbia e, portanto, a obtenção de energia das BAL ocorre por meio de fermentação de carboidratos, que produz como principal produto final o ácido láctico (LEROY e DE VUYST, 2004; BORDIGNON JUNIOR *et al.*, 2010; RATTANACHAIKUNSOPON e PHUMKHACHORN, 2010).

Em relação à fermentação, as BAL apresentam atividades homofermentativas e heterofermentativas, tendo como base a formação de produtos finais decorrentes da fermentação de glicose. Bactérias homofermentativas produzem ácido láctico como produto principal da fermentação da glicose, enquanto as heterofermentativas obtêm menor produção de ácido láctico. Porém, sintetizam etanol e, em alguns casos, ácido acético e/ou dióxido de carbono em quantidades equimolares (FORSYTHE, 2002; TANNOCK, 2004; MASSAGUER, 2005). Considerando tais características, Hammes e Vogel (1995) classificaram essas bactérias em três grupos distintos: homofermentativos obrigatórios, heterofermentativos facultativos e heterofermentativos obrigatórios.

As BAL apresentam distribuição ubiqüitária na natureza, podendo ser habitantes dos tratos digestivos, respiratório superior e urogenital inferior de seres humanos e outros animais (LÓPEZ-DÍAZ *et al.*, 2000; HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002). Devido à natureza quimiotrófica e fermentativa, bem como às exigências nutricionais complexas desses microrganismos, sua presença ocorre, predominantemente, em alimentos ricos em carboidratos, proteínas, vitaminas e de baixa tensão de oxigênio, justificando, portanto, sua

prevalência em alimentos fermentados, tais como produtos lácteos e carnes, vegetais e bebidas fermentados (SAVADOGO *et al.*, 2006; PATRICK, 2012).

Originalmente, o grupo das BAL foi subdividido em quatro gêneros, dentre eles: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Após revisões taxonômicas, propôs-se a inclusão de novos gêneros, e, atualmente, esse grupo é compreendido por treze gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (PATRICK, 2012). A classificação das BAL em diferentes gêneros está intimamente relacionada com sua morfologia, tipo de fermentação, crescimento em diferentes temperaturas e em elevadas concentrações de sal, bem como habilidade de tolerância à ácidos e álcalis (KHALID, 2011).

O conhecimento taxonômico de cepas permite inferir sobre sua origem, habitat e fisiologia, e, portanto, facilita a sua seleção para uso em alimentos (HOLZAPFEL *et al.*, 2001). Dentre os gêneros de BAL, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* têm grande importância para a indústria de alimentos, tanto por sua habilidade fermentativa quanto por seus benefícios à saúde (RATTANACHAIKUNSOPON e PHUMKHACHORN, 2010).

Para a realização deste trabalho, foram utilizadas bactérias lácticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*. As bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* foram compreendidas pelas espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus diolivorans*, *Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus mali* e *Lactobacillus satsumensis*, enquanto que os gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc* incluíram as espécies *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc mesenteroides*, respectivamente. Essas bactérias serão abordadas com maiores detalhes nos subitens seguintes.

3.1.1. Gênero *Lactobacillus*

Lactobacillus apresentam-se como eubactérias taxonomicamente pertencem ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Lactobacillaceae (EUZÉBY, 2014a), sendo o maior dentre todos os gêneros de BAL, com mais de uma centena de espécies reconhecidas. Esse gênero, altamente heterogêneo, compreende bactérias com propriedades fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas muito variáveis, que se apresentam como Gram-positivo, catalase-negativo, não esporogênicas (AXELSSON, 2004; DELLAGLIO e FELIS,

2005; POT e TSAKALIDOU, 2009). Homo ou heterofermentativas, essas bactérias são exigentes nutricionalmente e podem ser encontradas em ambientes nos quais carboidratos estão disponíveis, como plantas, animais e alimentos (HAMMES e VOGEL, 1995; TANNOCK, 2004; CLAEISSON *et al.*, 2008).

Por serem considerados seguros (GRAS) e dotados de grande variedade de atividade catabólica, os lactobacilos são um dos mais importantes microrganismos no que diz respeito à microbiologia de alimentos e à nutrição humana devido ao fato de algumas cepas possuírem papel fundamental na produção e preservação de alimentos, além de propriedades probióticas (CARR *et al.*, 2002; HUYS, *et al.*, 2006).

3.1.1.1. *Lactobacillus casei*

Este grupo é constituído pelas espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zeae* e *Lactobacillus rhamnosus*, que apresentam semelhanças fisiológicas e metabólicas. Heterofermentativos facultativos, esses microrganismos podem colonizar diversos ecossistemas, naturais ou artificialmente criados pelo homem (FELIS e DELLAGLIO, 2007). Devido à heterogeneidade e à limitação de métodos taxonômicos, a classificação e diferenciação das espécies deste grupo são historicamente controversas (FELIS *et al.*, 2001).

Apesar da insuficiente nomenclatura taxonômica, cepas de *Lactobacillus casei* são significativamente importantes para a indústria de alimentos, e, devido à sua versatilidade, têm sido utilizadas como probióticos e bioconservantes em diversos alimentos industrializados, bem como culturas iniciadoras produtoras de ácido e intensificadoras de sabor em produtos lácteos (BURITI e SAAD, 2007; TOH *et al.*, 2013).

Uma das mais conhecidas cepas pertence a esse grupo, *Lactobacillus casei shirota* foi responsável por constituir a base para estabelecimento da companhia Yakult (SHORTT, 1999). Estudos demonstram o benefício do consumo regular desse leite fermentado, tais como imunomodulação e melhora de parâmetros gastrintestinais (HORI *et al.*, 2002; KOEBNICK *et al.*, 2003; TAKEDA e OKUMURA, 2007; IVORY *et al.*, 2008).

3.1.1.2. *Lactobacillus kefir*

Cepas dessa espécie foram detectadas em grãos de kefir de leite e isoladas de produtos lácteos da Mongólia e em grãos de kefir de leite, inclusive do Brasil (HEO e LEE, 2006; KESMEN e KACMAZ, 2011; YU *et al.*, 2011; ZANIRATI, 2012; LEITE *et al.*, 2013^a; ÜNAL e ARSLANOĞLU, 2013). Em estudo de Heo e Lee (2006), foram descritas características filogenéticas de dois principais microrganismos isolados de kefir, sendo uma das cepas (cepa A) taxonomicamente correspondente a *Lactobacillus kefir*. Segundo os autores, a cepa A exibiu bastonetes com medidas de 0,6-0,8 x 1,5-3,0 µm, que ocorreram solitários, em pares ou em cadeias curtas. Catalase e oxidase-negativos, este microrganismo provou ser heterofermentativo facultativo, apresentando crescimento ótimo em meios MRS caldo e ágar, em condições de aerobiose e anaerobiose estrita, em temperatura aproximada de 30°C. As colônias, quando cultivadas em MRS ágar e após incubação de três dias, apresentaram-se brancas, lisas e opacas, de formato circular ou discretamente irregular.

3.1.1.3. *Lactobacillus diolivorans*

Inicialmente isolado de silagem de milho fermentada, leite fermentado na Mongólia e, recentemente, de grãos de kefir (KROONEMAN *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2011), este microrganismo foi nomeado por seu descobridor devido à sua capacidade de degradar 1,2-propanodiol (di.o.li.vo'rans. N.L. *Diol* de 1,2-propanodiol; L. v. *vorare* de devorar; N.L. adj. *Diolivorans* - devorador de diois). Está agrupado na mesma árvore filogenética de *Lactobacillus kefir* e, portanto, exhibe características similares a essa espécie: bastonetes não esporogênicos, imóveis, Gram-positivo e catalase-negativo, que podem ocorrer solitários ou em pares. Anaeróbio facultativo e heterofermentativo, *Lactobacillus diolivorans* apresenta colônias brancas em meio MRS, com células que medem 1 x 2 µm com 1,2-propanodiol como substrato, e maiores que 10 µm em glicose (KROONEMAN *et al.*, 2002).

3.1.1.4. *Lactobacillus perolens*

Pela primeira vez descrito por Back (1999), este microrganismo ácido tolerante e heterofermentativo facultativo foi isolado de refrigerantes deteriorados e de cervejarias. Seu nome remete ao odor penetrante provocado pela elevada produção de diacetil (*per.o'lens* L.

pref. *per* através, penetrante; L. part. adj. *olens* odor; N.L. part. adj. *Perolens* - odor desagradável).

Em relação às características físicas e bioquímicas, *Lactobacillus perolens* apresenta bastonetes imóveis, de extremidades arredondadas, medindo 0,7 x 2,5 µm, que podem ocorrer solitários, em pares ou em cadeias curtas. Quando cultivado em meio MRS, suas colônias exibem coloração de bege a branco, formato convexo e levemente ondulado, com diâmetro aproximado de 2,5 mm. Seu crescimento ótimo ocorre em pH entre 5,5-6,5 e em temperatura entre 28-32°C (WINSLOW *et al.*, 2009).

O isolamento dessa espécie em grãos de kefir cultivados com água com açúcar mascavo foi relatado por Zanirati (2012). Há, também, relato de seu isolamento de leite de vaca, no qual foi possível confirmar sua característica probiótica por meio de testes *in vitro*, que avaliaram sua habilidade de agregação e inibição de patógenos típicos causadores de mastite (FROLA *et al.*, 2012).

3.1.1.5. *Lactobacillus kefiranofaciens*

Proposta por Fujisawa *et al.* (1988), esta espécie foi descoberta em grãos de kefir, fato que deu origem a seu nome (ke.fi.rano.fa'ci.ens L. n. *kefiran*, um polissacarídeo de grão de kefir, kefiran; L. v. *facio* produz; M. L. part. adj. *Kefiranofaciens* - produtor de kefiran).

Composto por bacilos imóveis e encapsulados, que podem medir de 0,8-1,2 x 3,0-20,0 µm e ocorrer solitários, em pares ou em cadeias curtas, esse microrganismo é anaeróbio facultativo e homofermentativo obrigatório. Quando cultivado em ágar KPL modificado (pH 5,5), apresenta colônias de formato circular ou irregular, de coloração branca, transparentes a translúcidas, com diâmetro entre 0,5 a 3,0 mm após 10 dias a 30°C. Possui duas sub-espécies: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* e *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* (FUJISAWA *et al.* 1988; WINSLOW *et al.*, 2009).

3.1.1.6. *Lactobacillus mali*

Originalmente isolado de suco de maçã recém-prensado, *Lactobacillus mali* tem tal denominação em referência ao ácido málico presente naquela fruta. Homofermentativas e anaeróbias facultativas, suas cepas apresentam-se em forma de bacilo, medindo 0,6 x 1,8-4,2 µm, podendo ocorrer isoladamente, em pares ou em grupos irregulares. São móveis e

possuem poucos flagelos peritríquios. A maioria das cepas apresenta pseudocatalase quando cultivadas em meio MRS ágar enriquecido com 0,1% de glicose (CARR e DAVIES, 1970). Recentemente, *Lactobacillus mali* também foi identificada em grãos de kefir fermentados com açúcar mascavo, mosto de uva e vinho (RODAS *et al.*, 2003; RODAS *et al.*, 2005; HSIEH *et al.*, 2012).

3.1.1.7. *Lactobacillus satsumensis*

Geneticamente similar a *Lactobacillus mali*, a recente descoberta desta espécie ocorreu em Satsuma, antigo nome para a região sul de Kyushu, no Japão, dando origem à sua denominação. Isolados de shochu fermentado em meio de cultura enriquecido, os bacilos desta espécie são móveis, com flagelos peritríquios, e podem medir 0,6-0,8 x 1,0-1,5 µm, ocorrendo isoladamente ou em pares. São anaeróbios facultativos, catalase-negativo e homofermentativos. Quando cultivadas em MRS ágar, as colônias de *Lactobacillus satsumensis* apresentam coloração branca, aspecto liso e diâmetro aproximado de 2 mm. (ENDO e OKADA, 2005).

3.1.2. Gênero *Lactococcus*

O gênero *Lactococcus* foi criado com o objetivo de reclassificar espécies dos gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus* (SCHLEIFER *et al.*, 1985). Presentes em diversos ecossistemas, como plantas, peles de animais e alimentos, microrganismos desse gênero apresentam-se em forma de cocos Gram-positivo, microaerofílicos e homofermentativos, com produção exclusiva de ácido lático L (+) (SAMARŽIJA *et al.*, 2001; CASALTA e MONTEL, 2008).

Eubactérias pertencentes ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Streptococcaceae, esse gênero atualmente é composto por oito espécies: *Lactococcus taiwanensis*, *Lactococcus chungangensis*, *Lactococcus fujiensis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactise* e *Lactococcus lactis*, sendo essa última constituída em quatro subespécies: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* (EUZÉBY, 2014b).

Bactérias desse gênero são frequentemente encontradas em produtos lácteos, sendo as subespécies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* comumente utilizadas como culturas iniciadoras para a produção de produtos lácteos fermentados (BERESFORD *et al.*, 2001). Devido às suas propriedades tecnológicas, *Lactococcus* é amplamente utilizado na indústria de produtos lácteos, como queijos e coalhada, tendo como função principal o desenvolvimento de atividades acidificantes e proteolíticas, e, conseqüentemente, de textura, sabor e aroma, de modo a contribuir positivamente para a percepção sensorial (SMIT *et al.*, 2005; CASALTA e MONTEL, 2008). Ainda, *Lactococcus* podem atuar como bioconservadores, por meio da produção de compostos antimicrobianos, como os ácidos orgânicos e bacteriocinas. Estudos descrevem cepas bacteriocinogênicas de *Lactococcus* que apresentaram atividade antimicrobiana contra patógenos de importância alimentar (CHOI *et al.*, 2000; RODRÍGUEZ *et al.*, 2005; COSENTINO *et al.*, 2012; HELLAL *et al.*, 2012) fato que ressalta, portanto, uma potencial solução para o controle de microrganismos indesejados, como *Listeria monocytogenes*.

Além das funções sensoriais, as bactérias lácticas desse gênero podem contribuir para os aspectos nutricionais. Em estudo de Li *et al.* (2012), demonstrou-se que uma cepa recombinante de *Lactococcus lactis* MG1363, com atividade de β -galactosidase, foi efetiva em reduzir os sintomas de diarreia causados pela ingestão de lactose em camundongos BALB/c intolerantes à lactose. O provável mecanismo de promoção e colonização da microbiota intestinal por BAL torna a cepa recombinante *Lactococcus lactis* MG1363 um potencial probiótico para uso em pacientes intolerantes à lactose.

Apesar de relatos de casos infecciosos envolvendo *Lactococcus* (FEFER *et al.*, 1998; ZECHINI *et al.*, 2006; HIRAKAWA *et al.*, 2011; WATANABE *et al.*, 2011; RUSSO *et al.*, 2012), a baixa incidência de infecções em humanos e o longo histórico de uso e consumo são suficientes para considerá-los seguros (CASALTA e MONTEL, 2008; ASHRAF e SHAH, 2011).

3.1.3. Gênero *Leuconostoc*

O gênero *Leuconostoc* compreende cocos Gram-positivo, catalase-negativo, anaeróbios facultativos e heterofermentadores de glicose, dispostos em pares ou em cadeias. Além da presença em seu habitat natural, as plantas (*leucos*, claro, luz; *nostoc*, nome genérico de algas; *Leuconostoc*, incolor), esses microrganismos também são encontrados em açúcar

processado e produtos lácteos, exercendo papel importante em processos industriais e na fermentação de alimentos (OGIER *et al.*, 2008).

Taxonomicamente, são pertencentes ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Leuconostocaceae. Este gênero, atualmente, é composto por 22 espécies. A espécie *Leuconostoc mesenteroides* apresenta quatro subespécies (*Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc cremoris* e *Leuconostoc suionicum*) (EUZÉBY, 2014c). Naturalmente presentes em produtos lácteos, como queijos e kefir, esses microrganismos são essenciais para a formação de aroma e textura. Dentre as espécies que desempenham esse papel, estão *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc lactis*, que produzem compostos aromáticos a partir da metabolização de citrato (HEMME E FOUCAUD-SCHEUNMANN, 2004).

Além de sua contribuição para os aspectos tecnológicos, estudos demonstram a capacidade de algumas cepas de *Leuconostoc* em produzir bacteriocinas e substâncias similares a bacteriocinas inibidoras de patógenos, como *Listeria monocytogenes*, tornando-as potenciais agentes bioconservadores (MATARAGAS *et al.*, 2002; SAWA *et al.*, 2010; ASAHINA *et al.*, 2012; WAN *et al.*, 2012).

Por outro lado, a presença de *Leuconostoc* também está relacionada com a deterioração de determinados alimentos, devido à produção de compostos indesejáveis, como as aminas biogênicas. Ainda, há relatos na literatura do envolvimento desses microrganismos em infecções humanas, em sua maioria em pacientes imunodeprimidos, resultando em sua classificação como patógenos oportunistas (HEMME e FOUCAUD-SCHEUNMANN, 2004). Entretanto, ainda não está estabelecida a importância clínica dessas bactérias em infecções envolvendo seres humanos saudáveis.

3.1.4. Bactérias lácticas como probióticos e utilização na indústria de alimentos

O conceito de probióticos foi utilizado pela primeira vez na literatura científica por Lilley e Stillwell (1965) ao se referirem às bactérias lácticas como “microrganismos que promovem o crescimento de outros microrganismos”. Até então, diversas definições sobre probióticos foram publicadas e, atualmente, a definição reconhecida consiste em “microrganismos viáveis que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001; SCHREZENMEIR e DE VRESE, 2001; SANDERS, 2008). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) conceitua

probióticos como “microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo” (BRASIL, 2002).

Recentemente, as BAL têm sido utilizadas como probióticos na saúde humana devido aos seus potenciais efeitos benéficos, como proteção do organismo contra infecções gastrintestinais, modulação de resposta imune, favorecimento da tolerância à lactose, redução do acúmulo de compostos tóxicos ou cancerígenos e controle de alguns tipos de câncer e, ainda, diminuição dos níveis séricos de colesterol (SAARELA *et al.*, 2000; MARTEAU *et al.*, 2001; SANDERS, 2003; ISOLAURI *et al.*, 2004; REID e RAMMOND, 2005; KECHAGIA *et al.*, 2013).

De acordo com a International Dairy Federation (IDF), diversos microrganismos possuem histórico documentado de uso em alimentos e, portanto, são considerados ingredientes alimentares seguros. Dentre esses, encontram-se *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus diolivorans*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus satsumensis*, pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, os quais podem ser utilizados em produtos lácteos, cereais, frutas e legumes. Por sua vez, as espécies *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, pertencentes ao gênero *Lactococcus*, podem ser utilizadas como culturas iniciadoras em produtos lácteos, enquanto que espécies de *Leuconostoc mesenteroides*, pertencentes ao gênero *Leuconostoc*, podem ser aplicadas em produtos lácteos e legumes (MOGENSEN *et al.*, 2002).

Além de constituírem um atrativo devido ao seu potencial efeito benéfico, essas bactérias são amplamente utilizadas no setor de tecnologia de alimentos por promoverem melhoria das características sensoriais e por contribuírem com a preservação de alimentos (DE MARTINIS *et al.*, 2003). Suas ações podem modificar positivamente atributos de textura, sabor, aroma, cor, digestibilidade, bem como qualidades nutricionais do produto fermentado por meio da produção de ácidos e outras substâncias que conferem sabor e aroma específicos em produtos fermentados (LEROY e DE VUYST, 2004; AMMOR e MAYO, 2007; GÁLVEZ *et al.*, 2007; RAMIREZ *et al.*, 2011).

Em processos de conservação, as BAL são participantes ativas e contribuem para a qualidade higiênico-sanitária e aumento de vida útil de seus produtos ao interferirem, direta ou indiretamente, no processo de multiplicação de microrganismos deterioradores ou patogênicos, eventualmente presentes, por meio de diversos mecanismos. Dentre esses mecanismos, o principal consiste na produção de substâncias inibitórias potencialmente letais,

como ácidos orgânicos, dióxido de carbono, alcoóis, aldeídos, peróxidos de hidrogênio e bacteriocinas, (OLIVEIRA *et al.*, 2008), sendo essa última uma substância antagônica de grande interesse para a indústria de alimentos por não provocar alterações sensoriais e possuir atividade específica contra determinados patógenos (DE MARTINIS *et al.*, 2002; HAJIKHANI *et al.*, 2007; VÁSQUEZ *et al.*, 2009).

3.2. Bacteriocinas

As BAL podem sintetizar diversas substâncias antimicrobianas com capacidade de inibição de crescimento de microrganismos deterioradores ou patogênicos em alimentos, sendo as bacteriocinas um grupo de grande interesse devido ao seu potencial de aplicação na preservação de alimentos (KHAY *et al.*, 2011).

3.2.1. Definição e caracterização

A primeira referência à inibição mediada por bacteriocinas foi realizada há mais de um século por Pasteur e Joubert (1877), em que os achados sugeriram que bactérias isoladas de amostras de urina poderiam interferir no crescimento de *Bacillus anthracis*. Entretanto, o termo ‘bacteriocina’, proposto há mais de 60 anos por Jacob *et al.* (1953), foi originalmente utilizado para descrever a colicina, um protótipo de bacteriocina de bactérias Gram-negativo. Apenas em 1976, Tagg *et al.* definiu as bacteriocinas como compostos de natureza protéica que inibem bactérias estritamente relacionadas.

Atualmente, as bacteriocinas são definidas como um grupo abundante e diverso de peptídeos antimicrobianos, de síntese ribossomal e liberação extracelular, produzidos por bactérias Gram-positivo e Gram-negativo (DOBSON *et al.*, 2012). Além da natureza protéica, as bacteriocinas são caracterizadas por espectro de atividade restrito, de efeito bactericida ou bacteriostático, contra bactérias relacionadas com a cepa produtora e não letal à célula produtora (KARTHIKEYAN e SANTHOSH, 2009). Além disso, atribui-se às bacteriocinas um possível papel ecológico, na medida em que essas oferecem vantagem competitiva para as cepas produtoras ao auxiliá-las em competições em ambiente microbiano (DE VUYST *et al.*, 1996).

Erroneamente confundidas com antibióticos, as bacteriocinas diferem claramente daqueles por diversas razões. Os antibióticos são metabólitos secundários e têm aplicação

clínica e, em geral, possuem atividade de espectros variáveis, além de causarem efeitos colaterais. Por outro lado, as bacteriocinas, cuja aplicação é estritamente alimentícia, são peptídeos ribossomais de espectro de ação restrito e de natureza atóxica (CLEVELAND *et al.*, 2001).

Os determinantes genéticos responsáveis pela codificação e produção de bacteriocinas são, em sua maioria, de natureza plasmidial, apesar de os genes dessas substâncias também poderem ser codificados por cromossomo ou elementos genéticos móveis, como transposons (DIEP e NES, 2002). Tal fato é especialmente interessante por possibilitar a modificação das características desses peptídeos e de ampliar de seu espectro de ação (SAAVEDRA *et al.*, 2004).

Um fator de grande relevância para a aplicação comercial efetiva de bacteriocinas consiste em compreender e otimizar os fatores ambientais e tecnológicos envolvidos em sua produção. Apesar da escassez de detalhes a respeito dos parâmetros fisiológicos e tecnológicos, vários fatores físico-químicos parecem afetar a produção de bacteriocinas, bem como sua atividade (YUSUF e HAMID, 2012). A biossíntese de bacteriocinas ocorre durante a fase exponencial, representada pela curva de crescimento microbiano, atingindo seu pico durante o meio ou fim desta fase ou, ainda, no início da fase estacionária (ZAMFIR *et al.*, 2000). De modo geral, a máxima produção dessas substâncias é favorecida quando o microrganismo é cultivado sob condições de crescimento menos favoráveis, ou seja, sob condições de estresse, tais como temperaturas sub ótimas, pH ácido, presença de compostos potencialmente tóxicos e microbiota competidora, entre outros fatores (DE VUYST *et al.*, 1996). Evidentemente, esses fatores mencionados podem ser facilmente controlados durante a execução de experimentos *in vitro*; porém, esta situação altera consideravelmente quando a produção e atividade de bacteriocinas são conduzidas em modelos *in situ*, ou seja, no próprio alimento.

3.2.2. Propriedades físico-químicas

As bacteriocinas fazem parte de sistemas defesa inatos de microrganismos e, em geral, têm em comum baixo peso molecular (<10 kDa), natureza catiônica e anfipática, estabilidade ao calor e espectro de ação limitado que permite inibição de cepas de mesma espécie ou de espécies relacionadas (ZACHAROF e LOVITT, 2012).

Bacteriocinas de bactérias Gram-positivo são, em sua maioria, pequenos peptídeos, de peso molecular entre 3-6 kDa, de espectro de ação variado (NES *et al.*, 1996; HERRANZ, 2001), sendo aquelas produzidas por BAL foco de grande interesse. Nos últimos anos, bacteriocinas originadas de bactérias Gram-positivo, incluindo os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* e alguns membros de *Streptococcus*, têm sido alvo de intenso estudo em diversos níveis, inclusive em relação à caracterização molecular (HALAMI *et al.*, 2000; MAQUEDA *et al.*, 2008), devido ao potencial prático de aplicações como bioconservadores e probióticos (MEHTA *et al.*, 2013).

Entretanto, com a crescente descoberta e caracterização de novas bacteriocinas, incluindo aquelas produzidas por bactérias Gram-positivo, tornou-se evidente que esse é um grupo de compostos bastante heterogêneo (REA *et al.*, 2011). Devido às diferenças de espectro de atividade, características bioquímicas e determinantes genéticos, sugere-se uma proposta de classificação para as bacteriocinas de BAL (Apêndice A) que, fundamentada em sua estrutura primária, peso molecular, estabilidade ao calor e organização molecular, subdivide-se em quatro classes. Há inúmeras propostas de classificação de bacteriocinas de BAL disponíveis (REA *et al.*, 2011; COTTER *et al.*, 2013); entretanto, por ser uma área em que a pesquisa é muito dinâmica, ainda não se pode estabelecer um sistema de classificação definitivo (ZOUHIR *et al.*, 2010).

3.2.3. Espectro de atividade

A atividade antimicrobiana das bacteriocinas está intimamente relacionada com o organismo produtor (GHANBARI *et al.*, 2009) e possui espectro variável, podendo ser restrito, quando se limita a determinadas linhagens de espécies taxonomicamente relacionadas, ou amplo, na medida em que inclui ação em microrganismos deteriorantes de alimentos e/ou patogênicos, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens* (MAGRO *et al.*, 2000).

Quanto ao mecanismo de ação, em geral, as bacteriocinas provocam desestabilização funcional da membrana citoplasmática de células sensíveis. Em sua maioria, as bacteriocinas de BAL são ativas somente frente a bactérias Gram-positivo, já que a estrutura e composição da parede celular de bactérias Gram-negativo, bolores e leveduras impede o acesso das bacteriocinas a seu local de ação, a membrana citoplasmática (GONG *et al.*, 2010).

A heterogeneidade do espectro de ação antimicrobiana de bacteriocinas de BAL permite sua classificação de atividade em três grupos: (CINTAS *et al.*, 2001):

- a. espectro de ação reduzido: bacteriocinas ativas somente frente a cepas de mesma espécie ou frente a espécies de mesmo gênero;
- b. espectro de ação intermediário: bacteriocinas que inibem outras BAL distintas ao microrganismo produtor e a outras bactérias Gram-positivo como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*;
- c. espectro de ação amplo: bacteriocinas que, ademais às espécies já mencionadas, inibem outras, como *Propionibacterium* spp. e *Bacillus* spp.

3.2.4. Utilização de bactérias lácticas e bacteriocinas em alimentos

Diversos gêneros de BAL têm sido utilizados como agentes funcionais, cujas propriedades visam promover o aumento da estabilidade mediante inibição do crescimento de microrganismos indesejáveis, melhorar as características sensoriais, e, conseqüentemente, garantir a inocuidade desses alimentos (LÜCKE, 2000). A obtenção dessas bactérias com potencial probiótico ocorre por meio de seu isolamento de inúmeros alimentos, cujo objetivo consiste em selecionar cepas com características adequadas para utilização como culturas iniciadoras para a produção de alimentos fermentados, além de exercer função probiótica (PAPAMANOLI *et al.*, 2003; PENNACCHIA, *et al.*, 2004; MACEDO, 2005; DALLA SANTA, 2008).

Conforme mencionado, o papel das BAL na preservação de alimentos consiste em interferir na multiplicação de bactérias deterioradoras e patogênicas por meio de diversos mecanismos (AMMOR *et al.*, 2006). Considerando o atual cenário imposto pela emergência de microrganismos psicrotróficos em alimentos, a procura de alimentos naturais por consumidores e as propriedades físicas e químicas favoráveis das bacteriocinas para aplicação em alimentos, é natural o interesse da indústria de alimentos na produção desses peptídeos antimicrobianos como potenciais bioconservadores capazes de controlar o desenvolvimento de microrganismos deterioradores e patogênicos.

As bacteriocinas produzidas por BAL possuem uma gama de propriedades desejáveis para preservação de alimentos: são geralmente reconhecidas como substâncias seguras; são inócuas e atóxicas para células eucarióticas; são inativadas por proteases digestivas, tendo

pequena influência sobre a microbiota intestinal; normalmente, são tolerantes a alterações de pH e termo-tolerantes; possuem espectro de ação relativamente amplo contra bactérias patogênicas e deterioradoras de alimentos; a ação bactericida ocorre geralmente sobre a membrana citoplasmática bacteriana, não apresentando resistência cruzada com antibióticos; usualmente são codificadas por plasmídios, facilitando a manipulação genética (GÁLVEZ *et al.*, 2007). Portanto, seu campo de aplicação é vasto, com utilização na produção primária, na industrialização e na estabilidade durante o armazenamento de alimentos (GARCÍA *et al.*, 2010).

As propriedades físicas das bacteriocinas são responsáveis por sua adaptação no ambiente de produção e, conseqüentemente, por manter sua atividade antimicrobiana. Portanto, o potencial de aplicação de determinada bacteriocina pode ser predito por suas propriedades, que incluem estabilidade à temperatura, pH e espectro de ação como as mais importantes para tal previsão (ROSS, 1999). Em geral, esses peptídeos são adequados para uso em indústrias de alimentos, devido ao fato de serem termoestáveis e passíveis de inativação proteolítica (JEEVARATNAM *et al.*, 2005).

Alguns fatores influenciam a atividade de bacteriocinas aplicadas em alimentos, como mudança na solubilidade e na carga eletrostática; sua ligação aos componentes do alimento; sua inativação por proteases e, por fim, mudanças na parede ou na membrana celular dos microrganismos-alvo como resposta a fatores ambientais (SETTANNI *et al.*, 2005). Outra questão a ser considerada é a difusão das bacteriocinas na matriz alimentícia, que pode ser modificada por concentração de sal, pH, nitrito e nitrato, fase aquosa disponível para difusão, conteúdo lipídico, superfície lipídica disponível para solubilização e, em maior nível, pela distância que a molécula de bacteriocina precisa percorrer para alcançar a célula-alvo e pelo número dessas células com relação à quantidade do antimicrobiano (BOUTTEFROY *et al.*, 2000; THOMAS *et al.*, 2000).

Quanto à aplicação propriamente dita, a introdução das bacteriocinas como bioconservadores em alimentos pode ocorrer por três diferentes métodos. Uma das abordagens refere-se à inoculação de BAL bacteriocinogênicas em alimentos, cujo uso bem sucedido depende diretamente da habilidade de crescimento de BAL e de produção de bacteriocinas nesses produtos alimentícios. As outras duas técnicas consistem em adição direta de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas como conservantes e em utilização de cepas de BAL bacteriocinogênicas como ingredientes ou culturas adjuntas em fermentação de alimentos (CHEN E HOOVER, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2008).

A eficácia da atividade de algumas bacteriocinas já foi testada em alimentos, principalmente em produtos cárneos, lácteos e fermentados, com relativo sucesso (CLEVELAND *et al.*, 2001; DE VUYST e LEROY, 2007). Porém, a autorização que regulamenta o uso de bacteriocinas em alimentos depende do alimento em que a bacteriocina será adicionada e do propósito de sua adição. O uso de bacteriocinas purificadas, microrganismos produtores de bacteriocinas ou expressão genética de bacteriocinas em microrganismos produtores de alimentos são, atualmente, regulamentados como ingredientes alimentares e reconhecidos como substâncias seguras (YANG *et al.*, 2012; AGRAWAL e DHARMESH, 2012; NWUCHE, 2013). Essa decisão é fundamentada em pesquisas científicas e no fato de tais agentes já estarem presentes historicamente em alimentos sem, no entanto, apresentarem intercorrências. De acordo com esse último critério, o simples fato de bacteriocinas produzidas por BAL serem frequentemente isoladas de alimentos fermentados permite sua aceitação como GRAS (JEEVARATNAM *et al.*, 2005).

A nisina, produzida por certas linhagens de *Lactococcus lactis*, é uma bacteriocina capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivo e de esporos de *Clostridium* e *Bacillus* (SCHULZ *et al.*, 2003). Em 1988, a nisina foi concedida com o status de GRAS e considerada segura como aditivo alimentar pela Food and Drug Administration/World Health Organization (FAO/WHO) (MELO *et al.*, 2005), sendo a única bacteriocina permitida para uso em alimentos (DE MARTINIS *et al.*, 2003). O uso desse peptídeo antimicrobiano em alimentos é aprovado em 47 países, sendo que, no Brasil, sua utilização é permitida em preparados à base de queijos fundidos e em queijos fundidos, requeijão e queijo pasteurizado, além de superfícies externas de embutidos (ROSA e FRANCO, 2002).

3.3. Kefir

Originário da região do Cáucaso e, atualmente, presente na dieta de várias partes do mundo, incluindo o sudeste asiático e Japão, leste e norte da Europa e América do Norte (SARKAR, 2007), o kefir é uma bebida viscosa, refrescante, de sabor levemente ácido e picante, produzida a partir de grãos de kefir, cuja associação simbiótica entre leveduras e BAL é responsável pela fermentação ácido-lática do leite (LOPITZ-OTSOA *et al.*, 2006; MARSH *et al.*, 2013). Estes grãos são compostos por uma matriz gelatinosa, de natureza polissacarídica - denominada kefiran -, que, por sua vez, consiste em uma complexa mistura de microrganismos aderidos a esta matriz, cuja composição varia conforme a origem do grão

e as condições ambientais de cultura e de armazenamento (GARROTE, 2001; HSIEH *et al.*, 2012; ŠINKO *et al.*, 2013).

Segundo a legislação brasileira vigente, o kefir, definido como leite fermentado, é um “produto resultante da fermentação de leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios, cuja fermentação se realiza com cultivos acidolácticos elaborados com grãos de Kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono”, sendo seus grãos constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* spp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*” (BRASIL, 2007).

A composição microbiana de grãos de kefir sofre influência de fatores, tais como a região geográfica de origem, o tempo de utilização, o substrato utilizado para proliferação dos grãos e as técnicas utilizadas para manipulação (WSZOLEK *et al.*, 2001; WITTHUHN *et al.*, 2004). Entretanto, apesar dessa composição variável, os gêneros de bactérias lácticas mais comuns em grãos desse alimento são *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* (JIANZHONG *et al.*, 2009; MAGALHÃES *et al.*, 2011; LEITE *et al.*, 2012).

As BAL identificadas em grãos de kefir e em sua bebida incluem espécies de *Lactobacillus* homofermentativas (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* e *Lactobacillus acidophilus*), bem como espécies de *Lactococcus* (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*). As bactérias heterofermentativas incluem *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus brevis*, além de cepas citrato-positivo de *Lactococcus lactis* (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. As leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefir*, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*, *Debaryomyces hansenii* e *Dekkera anomala*) e não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia fermentans*, *Kazachstania unispora*, *Saccharomyces turicensis*, *Issatchenkia orientalis* e *Debaryomyces occidentalis*) também estão presentes e interagem com as BAL em uma relação de interdependência ainda pouco compreendida (LEITE *et al.*, 2013^b).

De modo geral, as bactérias lácticas em grãos de kefir ocorrem em maior número (10^8 - 10^9 UFC/g) do que bactérias acéticas (10^5 - 10^6 UFC/g) e leveduras (10^5 - 10^6 UFC/g). Entretanto, esse padrão pode ser alterado segundo condições de fermentação e de armazenamento (GARROTE, 2001; IRIGOYEN *et al.*, 2005; FARNWORTH, 2005). Ainda, as concentrações desses microrganismos podem variar consideravelmente em grãos de kefir, cultura mãe e bebida.

O uso de culturas bacterianas probióticas exerce influência positiva sobre a microbiota intestinal humana, incluindo efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos que, por meio do estímulo à multiplicação de microrganismos benéficos e consequente inibição de desenvolvimento de bactérias potencialmente prejudiciais, reforça os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro. (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2002). O kefir, como um alimento dotado de microrganismos com propriedades probióticas, pode exercer atividades antibacteriana, antifúngica, antitumoral, entre outros atributos benéficos (ZUBILLAGA *et al.*, 2001; DICKS e BOTES, 2010).

Além das bactérias e leveduras benéficas, o kefir é reconhecido também por seus atributos nutricionais, compostos por vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais que auxiliam o tratamento e manutenção das funções corporais (OTLES e CAGINDI, 2003). Nos quadros 2 e 3, estão representados, respectivamente, a composição do kefir em relação aos padrões físico-químicos e microbiológicos definidos pela Food and Agriculture Organization of United Nations/World Health Organization (FAO/WHO) (2003) e os valores nutricionais do kefir (Anexos A e B).

O desenvolvimento e uso de kefir já está disponível comercialmente; entretanto, pelo fato de a maioria dos produtos serem elaborados com cepas isoladas de seus grãos, muitas propriedades naturais produzidas apenas pelos grãos, em função de sua complexa microbiota, não são encontradas nesses produtos. A presença do kefir no Brasil ainda é tímida, restringindo-se apenas a algumas famílias que, a partir do cultivo artesanal, tem como resultado um produto fermentado de qualidade e características variáveis. (BEZERRA *et al.*, 1999; MAGALHÃES *et al.*, 2010).

3.3.1. Ação probiótica de microrganismos de kefir

A composição química e microbiológica do kefir o tornam um produto probiótico, isto é, os microrganismos vivos presentes nesse alimento são capazes de garantir ou melhorar o

equilíbrio da microbiota intestinal, com consequente produção de efeitos benéficos à saúde do indivíduo (WESCHENFELDER *et al.*, 2011).

Além dos benefícios probióticos citados, atribui-se ao kefir atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, bem como contra alguns fungos (PĂUCEAN e SOCACIU, 2008). No caso de bactérias lácticas, essas propriedades antimicrobianas são atribuídas às bacteriocinas, produzidas pelos grãos de kefir e pelo próprio kefiran (RODRIGUES *et al.*, 2005). Além de bacteriocinas, outros metabólitos produzidos por bactérias lácticas são capazes de inibir o crescimento de bactérias patogênicas e saprófitas, por meio de inúmeros mecanismos (GHANBARI *et al.*, 2013). Em muitos casos, a combinação desses diversos mecanismos pode ser responsável pela inibição.

Estudos sobre a capacidade antimicrobiana de kefir são escassos na literatura; entretanto, há relatos sobre atividade inibitória de kefir contra microrganismos Gram-positivo e Gram-negativo.

Powell *et al.* (2007) isolaram e caracterizaram uma bacteriocina de *Lactobacillus plantarum* ST8KF de kefir que apresentou atividade contra *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus curvatus* e *Listeria innocua*.

Similarmente, Kojić *et al.* (2007) isolaram cepas de *Lactococcus lactis* de grãos de kefir produtoras de bacteriocinas, obtendo resultados de ação antimicrobiana frente a outras cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Já Silva *et al.* (2009) analisaram caldo de açúcar demerara fermentado com grãos de kefir. Através de halos de inibição, os autores observaram ação inibitória contra *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

O efeito antagonista de kefir contra microrganismos patogênicos também foi demonstrado por Anselmo *et al.* (2010). A partir da inoculação de uma população conhecida de células vegetativas e esporos de *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* em kefir de duas origens distintas, os autores observaram efeito bactericida das culturas de kefir, que reduziu essas populações em números não detectáveis após poucas semanas de armazenamento.

Ismail *et al.* (2011) testaram a atividade antimicrobiana de grãos de kefir, suspensões de kefir e kefiran contra diversas espécies de fungos e bactérias. Observou-se que as maiores atividades inibitórias ocorreram contra *Streptococcus faecalis* e *Fusarium graminearum*, enquanto que, em elevadas concentrações de filtrado de kefir, obteve-se inibição completa da esporulação de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxina B1.

Em estudo de Rahimzadeh *et al.* (2012), a avaliação de atividade antimicrobiana de extratos de kefir foi realizado por meio de método de microtitulação. Os valores obtidos pela técnica de concentração mínima inibitória demonstraram atividade inibitória significativa contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Ainda, outros trabalhos demonstram, mais especificamente, o poder inibitório de kefir contra *Listeria monocytogenes*.

Gulmez e Guven (2003), utilizando amostras de leite fermentadas apenas com kefir ou com kefir e iogurte, demonstraram efeito inibitório contra os microrganismos patogênicos *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* O3 e *Listeria monocytogenes* 4b.

Santos *et al.* (2003), por sua vez, testaram a atividade antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. isoladas de kefir, as quais apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Salmonella* Enteritidis e *Listeria monocytogenes*.

Kefir e seu polissacarídeo insolúvel, kefiran, foram testados quanto à sua atividade antimicrobiana por Rodrigues *et al.* (2005). Os autores observaram atividade inibitória, mais ou menos intensa, contra sete bactérias e um fungo, dentre eles *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

De modo similar, Ulusoy *et al.* (2007) demonstraram efeito antimicrobiano de kefir fermentado contra patógenos de importância alimentar, dentre os quais estão *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* por método de difusão em discos.

Utilizando o método do estudo anterior, Sirirat e Jelena (2010) avaliaram a atividade antibacteriana de leite de arroz e leite de vaca fermentados com kefir contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*, em que foi observada ação contra todos os microrganismos citados, com exceção do último.

Dias (2011) também observou ação inibitória contra *Listeria monocytogenes*, além de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* por microrganismos isolados de grãos de kefir.

Por fim, em estudo de Santos *et al.* (2013), amostras de grãos de kefir obtidas de três diferentes cidades da região sudeste do Brasil demonstraram efeito antagonista contra o crescimento de cinco microrganismos patogênicos, dentre eles *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*.

3.4. *Listeria monocytogenes*

Taxonomicamente pertencente ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Bacillales, família Listeriaceae, o gênero *Listeria* é composto, atualmente, por 12 espécies (*Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria grayi*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria murrayi*, *Listeria denitrificans*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria marthii*, *Listeria rocourtiae* e *Listeria weihenstephanensis*) (EUZÉBY, 2014d). A ampla distribuição desse microrganismo no meio ambiente se deve às suas características fisiológicas peculiares, que permitem sua sobrevivência e multiplicação sob condições, em geral, consideradas adversas a muitos outros microrganismos patogênicos (UHITIL *et al.*, 2004). Apenas duas espécies de *Listeria* são consideradas potencialmente patogênicas, *Listeria ivanovii* e *Listeria monocytogenes*; a primeira acomete ruminantes e raramente humanos, enquanto que a segunda se destaca como principal patógeno para o homem e animais (LIU, 2006; FAI *et al.*, 2011).

Historicamente, *Listeria monocytogenes* foi descrita pela primeira vez em 1926 por Murray *et al.*, que a denominou de *Bacterium monocytogenes* devido à característica monocítica apresentada por animais de laboratórios infectados experimentalmente por essa bactéria (FARBER e PETERKIN, 1991). Já no final do século XX, a partir de sua descrição inicial, ocorreram os primeiros isolamentos de *Listeria monocytogenes* de animais e seres humanos contaminados, bem como o relato de casos esporádicos de listeriose envolvendo, em sua maioria, trabalhadores em contato com animais doentes. Embora *Listeria monocytogenes* tenha sido utilizada como modelo para estudo de parasitismo intracelular e reconhecida como patógeno humano durante anos, sua classificação como patógeno de origem alimentar ocorreu somente no final de década de 1970 e início dos anos 1980, quando surtos alimentares envolvendo esta bactéria atraíram a atenção de órgãos governamentais e indústrias alimentícias (GEORGE *et al.*, 2005).

Listeria monocytogenes é um bacilo curto (0,4-0,5 x 0,5-2 μm), Gram-positivo, catalase-positivo, oxidase-negativo, não esporogênico e anaeróbio facultativo. Dotado de flagelos peritríquios, apresenta motilidade quando cultivado em temperaturas abaixo de 30°C; contudo, é imóvel a 37°C. É heterofermentativo e produz ácido lático, ácido acético e outros produtos finais a partir da fermentação de glicose. A fermentação de outros açúcares, como ramnose, resulta na produção de ácido, mas não de gás (MCLAUGHLIN e REES, 2009).

O cultivo desta bactéria em meio de cultura semissólido, em temperaturas entre 20-25°C, durante 8-24 horas, demonstra motilidade característica por tombamento em forma de “guarda-chuva” - imagem típica, que pode ser observada a olho nu - que ocorre devido à presença de flagelos peritríquios e à sua natureza microaerofílica (ALLERBERGER, 2003). Sob o cultivo em meio ágar nutriente, após 24 a 48 horas de incubação, as colônias de *Listeria monocytogenes* são arredondadas, translúcidas, convexas e de bordas regulares, de coloração cinza-azulada sob iluminação normal e de brilho verde azulado sob luz transmitida obliquamente (ROCOURT e BUCHRIESER, 2007).

Com base em reações sorológicas de antígenos somático (fator O) e flagelar (fator H), *Listeria monocytogenes* compreende cepas de 13 sorotipos, divididas em três linhagens: Linhagem I (sorotipos 1/2b, 3b, 4b e 4c), relacionada a casos de listeriose humana; linhagem II (sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c), relacionada a alimentos e casos clínicos animais; Linhagem III (sorotipos 4a e 4c), a menos comum das linhagens, relacionada a espécies animais e ambientais (NADON *et al.*, 2001). Cepas de *Listeria monocytogenes* dos sorotipos 4b, 1/2a, 1/2b e 1/2c correspondem a mais de 98% de isolados clínicos em casos de listeriose humana (WAGNER e MCLAUHLIN, 2008).

A faixa de temperatura ótima de seu crescimento compreende valores entre 30 a 37°C, embora, como microrganismo psicrotrófico, seu desenvolvimento possa ocorrer entre 1 a 45°C ou em temperaturas ainda mais baixas, no caso de algumas cepas (ROCOURT e BUCHRIESER, 2007). Convém ressaltar que esse patógeno apresenta características peculiares relativas à resistência térmica e capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração, podendo suportar repetidos congelamentos e descongelamentos (GERMANO e GERMANO, 2001). A faixa de pH para crescimento é bem ampla, situando-se entre 4,3 a 9,8 (WARRINER e NAMVAR, 2009). Outro fato especial em relação a essa bactéria é sua característica osmotolerante, que permite crescimento em elevadas concentrações de sal (até 20%) e em baixa atividade de água (a_w 0,91) (LADO e YOUSEF, 2007).

Ainda, *Listeria monocytogenes* apresenta distribuição ubiqüitária na natureza, podendo ser isolada de ambientes selvagens e domésticos, tais como solo, vegetação, água, insetos e animais (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). Surpreendentemente, esta bactéria pode ser habitante assintomática do trato intestinal de seres humanos e outros animais durante longo período de tempo; estima-se que sua presença ocorra em 5% ou mais da população saudável (RAMASWAMY *et al.*, 2007). Sua presença também pode ser constatada em alimentos, os

quais são implicados como o principal veículo de listeriose (SWAMINATHAN e GERNER-SMIDT, 2007).

Além da facilidade de infecção e transmissão, bem como habilidade de crescimento e sobrevivência sob diferentes condições ambientais, *Listeria monocytogenes* é também reconhecida por sua habilidade de adesão à superfícies e formação de biofilmes (VAN HOUDT e MICHIELS, 2010). Cepas persistentes desse patógeno, provenientes de diversas fontes - desde matéria prima contaminada até manipuladores de alimentos -, podem ser introduzidas em ambientes de processamento, onde, uma vez estabelecidas, podem permanecer durante anos, podendo provocar contaminações recorrentes no produto final (MARKKULA *et al.*, 2005). Ainda, a capacidade de colonização e adesão de *Listeria monocytogenes* à maioria das superfícies de equipamentos e utensílios (MØRETRØ e LANGSRUD, 2004), somada às condições encontradas em ambientes industriais, tais como umidade e temperatura elevadas e presença de matéria orgânica, dificultam a eliminação desse microrganismo das indústrias.

Portanto, devido à habilidade de multiplicação e sobrevivência em ampla variedade de habitats - incluindo a microbiota de animais e seres humanos (IVANEK *et al.*, 2006) - sob condições usualmente utilizadas para o processamento e controle de crescimento de microrganismo em alimentos (JALALI e ABEDI, 2008), *Listeria monocytogenes* é um microrganismo de difícil controle e, por esse motivo, de grande interesse em saúde pública e para a indústria de alimentos (GUDMUNSDOTTIR *et al.*, 2005).

3.4.1. Listeriose

O atual desafio enfrentado pela indústria é o desenvolvimento de produtos inócuos e de qualidade. Para tanto, é necessário que ao longo de toda a cadeia alimentar sejam mantidas condições higiênico-sanitárias adequadas, de modo a controlar as doenças transmitidas por alimentos (DTA).

As DTA constituem um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo, sendo responsáveis por elevados custos econômicos e sociais (WELKER *et al.*, 2010). De origem física, química ou biológica, essas doenças são transmitidas via oral por meio da ingestão de água ou de alimentos contaminados (VAN AMSON *et al.*, 2006), sendo as toxiinfecções de origem bacteriana reconhecidamente as mais frequentes, ocorrendo sob forma de surto ou casos individuais (VASCONCELOS, 2008). Os produtos de origem animal

constituem ambiente propício para o desenvolvimento de agentes patogênicos devido às suas características intrínsecas que, quando sob a ação simultânea de fatores extrínsecos, podem permitir o desenvolvimento de microrganismos em quantidades necessárias para causar enfermidades (MATARAGAS *et al.*, 2003).

Em nível mundial, os principais alimentos associados a surtos e casos esporádicos de DTAs são as carnes e seus derivados, cruas ou processadas (HUGHES *et al.*, 2007; RHOADES *et al.*, 2009). Esses produtos apresentam excelente meio para o crescimento microbiano (WELKER *et al.*, 2010), além da facilidade de contaminação durante as etapas de abate dos animais (VAN AMSON *et al.*, 2006). Já no Brasil, os alimentos de maior associação com surtos de DTA correspondem a alimentos mistos, ovos e produtos a base de ovos e doces e sobremesas (FOOD SAFETY BRAZIL, 2013). Os microrganismos responsáveis pela maioria das infecções e toxiinfecções associadas aos produtos cárneos correspondem à bactérias patogênicas, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (MESQUITA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2010).

Listeria monocytogenes é o agente etiológico da listeriose, uma grave infecção bacteriana que, embora relativamente rara, apresenta elevada taxa de mortalidade, atingindo valores de até 30%, apesar de tratamento antimicrobiano adequado (LECUIT, 2007). Ainda que menos comuns que outras enfermidades de origem alimentar, casos de listeriose representam impacto relevante na saúde pública, já que correspondem à mais elevada taxa de internação hospitalar (91%) entre os agentes patogênicos de origem alimentar e à terceira maior causa de morte dentre os patógenos transmitidos por alimentos (WIEDMANN, 2002; JEMMI e STEPHAN, 2006; SCALLAN *et al.*, 2011).

A contaminação de seres humanos e outros animais por esse patógeno pode ocorrer pelas vias oral, ocular, cutânea, respiratória ou urogenital (PEARSON e MARTH, 1990). Entretanto, apesar das diversas formas de transmissão, as infecções humanas por *Listeria monocytogenes* resultam, primariamente, da ingestão de alimentos contaminados (JEMMI e STEPHAN, 2006; RAMASWAMY *et al.*, 2007).

Considerando os alimentos contaminados como principal fonte de infecção, o trato intestinal constitui local de entrada para *Listeria monocytogenes* no organismo, que ocorre através das células epiteliais no ápice das microvilosidades. Nesta fase, a difusão ocorre tanto no interior da célula como entre uma célula e outra. Na fase seguinte, as bactérias são ingeridas por macrófagos, e, por estarem protegidas dos leucócitos polimorfo-nucleares, não ocorre resposta inflamatória significativa (MCLAUHLIN *et al.*, 2004).

O diagnóstico de listeriose em pacientes sintomáticos é confirmado a partir do isolamento clínico do microrganismo de fluidos estéreis, tais como sangue, fluido cefalorraquidiano, líquido amniótico/placenta, no caso de mulheres grávidas, e de seu posterior cultivo em meio seletivo e enriquecido (RAMASWAMY *et al.*, 2007; JANAKIRAMAN, 2008).

A dose mínima infecciosa para seres humanos não é determinada. No entanto, estima-se que a mesma varie entre 10^2 a 10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônia), dependendo da condição imunológica do hospedeiro e da virulência da cepa em questão (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; JEMMI e STEPHAN, 2006). A suscetibilidade do hospedeiro desempenha papel determinante no aparecimento de sintomas da doença, que ocorre com maior frequência em indivíduos comprometidos fisiológica ou patologicamente, o que faz de *Listeria monocytogenes* um patógeno oportunista (LIU, 2006). A população de risco é constituída por crianças, idosos, imunodeprimidos, grávidas, pacientes com câncer ou sob tratamento com drogas esteroidais ou citotóxicas, transplantados renais, alcoólatras e diabéticos (ROCOURT *et al.*, 2000; DONNELLY, 2001; MCLAUCHLIN *et al.*, 2004). A listeriose também pode acometer indivíduos saudáveis que ingerem quantidades elevadas desse microrganismo (FRYE *et al.*, 2002).

A listeriose manifesta-se por duas principais síndromes, invasiva e não invasiva, cuja diversidade clínica reflete a habilidade desse patógeno em vencer as barreiras do hospedeiro humano (HAMON *et al.*, 2006). A forma invasiva da listeriose ocorre, em geral, em indivíduos suscetíveis, apresentando-se como listeriose perinatal e listeriose no paciente adulto. Ambas apresentam sinais clínicos similares, caracterizados por quadros severos de infecção disseminada ou localizada no sistema nervoso central, tais como sepse, meningoencefalite, meningite, resultando em elevadas taxas de mortalidade (RAMASWAMY *et al.*, 2007).

Em mulheres grávidas, as quais têm 20 vezes mais risco de contrair listeriose quando comparadas com indivíduos saudáveis, essa doença é particularmente nociva. A infecção fetomaternal ou perinatal, resultado da invasão do feto via placenta, costuma ocorrer no terceiro semestre de gravidez, a partir do quinto mês. Na maior parte dos casos, as mulheres afetadas demonstram-se assintomáticas ou apresentam sintomas leves, similares ao de uma gripe - fadigas, dores de cabeça, dores musculares - e, devido à subestimação do quadro, é comum a ocorrência de mortalidade neonatal (DONNELLY, 2001; JANAKIRAMAN, 2008). Por outro lado, a incomum infecção neonatal tardia, que corresponde a 10-15% de casos

perinatais, pode ocorrer entre uma a oito semanas pós-parto e caracteriza-se por desenvolvimento de síndrome febril do recém-nascido, acompanhada de meningite e, em alguns casos, de gastroenterite e pneumonia (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; ABRAM *et al.*, 2003).

Em adultos, pode-se observar a ocorrência de listeriose pelas formas invasiva e não invasiva. A primeira caracteriza-se por quadros severos como meningite, sepse, endocardite, conjuntivite e sintomas similares à gripe. Devido ao longo período de incubação, por volta de 30 dias, o relato de surtos pode sofrer grandes variações temporais e geográficas (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). Por outro lado, o acometimento de indivíduos pela forma não invasiva de listeriose consiste em manifestações clínicas mais brandas, sendo os sintomas gastroentéricos os de maior relato em surtos. O período de incubação, neste caso, é curto, com média de 18-20 horas (DONNELLY, 2001).

O primeiro surto de listeriose documentado envolvendo alimentos ocorreu em 1979, em um hospital de Boston, Estados Unidos, envolvendo 23 pacientes, após o consumo de verduras contaminadas (HO *et al.*, 1986). Outro surto de listeriose, devido à contaminação de alimentos, ocorreu nas Províncias Marítimas, Canadá, em 1981, envolvendo 41 pessoas, dentre elas 34 neonatos e sete adultos, provocando 11 mortes. A causa foi atribuída ao consumo de salada industrializada de repolho cru, quando confirmou-se que o isolado de *Listeria monocytogenes* do alimento em questão era idêntico ao isolado obtido de pacientes infectados. Assim, pela primeira vez, obteve-se prova definitiva de transmissão via alimentos de *Listeria monocytogenes* (SCHLECH *et al.*, 1983).

Posteriormente, no século XX, inúmeros surtos de listeriose foram relatados ao redor do mundo (Apêndice B), todos em decorrência da transmissão de *Listeria monocytogenes* via alimentos de origens animal e vegetal (LOGUERCIO *et al.*, 2001). Apesar de ser um fenômeno mundial, a ocorrência dessa enfermidade é relatada sobretudo em países industrializados e, talvez, seja reflexo de diferentes hábitos e padrões alimentares, suscetibilidade do hospedeiro ou frequência de notificações (ROCOURT *et al.*, 2000).

No Brasil, a notificação de surtos e/ou casos envolvendo *Listeria monocytogenes* não é compulsória e, portanto, a escassez de dados não reflete de forma fidedigna a realidade da listeriose no país (FERRONATTO, 2010). Entretanto, estudos nacionais demonstram que a ocorrência dessa enfermidade em território nacional apresenta resultados similares aos de outros locais do mundo em relação à prevalência de sorotipos, com predomínio do sorotipo 4b, seguido pelo sorotipo 1/2a (BARANCELLI *et al.*, 2011).

Os primeiros casos de listeriose em território nacional ocorreram no período entre abril a dezembro de 1985, quando cinco pacientes transplantados renais de um mesmo hospital da cidade de São Paulo queixaram-se de febre. Análises laboratoriais revelaram presença de *Listeria monocytogenes*, caracterizada pelos sorotipos 1/2a e 4b, sendo o último resistente à penicilina (HOFER *et al.*, 1999).

No Instituto de Saúde do Distrito Federal, Brasília, no período de junho a setembro de 1989, foram descritos os primeiros casos de meningite por *Listeria monocytogenes*. A identificação sorológica revelou em dois casos a presença do sorotipo 4b e, em outro, o sorotipo 1/2a, tendo esse evoluído para óbito. Todos os pacientes - um neonato, uma criança e uma mulher portadora de lupus eritematoso sistêmico - eram pertencentes ao grupo de risco (HOFER *et al.*, 1998).

Já no ano 2000, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, realizou-se análise de dez placentas humanas provenientes de aborto, parto prematuro e nascimento a termo pela técnica de imunohistoquímica. Em 50% das amostras analisadas (cinco), foi constatada a presença de *Listeria monocytogenes* (SCHWAB e EDELWEISS, 2003). Toyoshima *et al.* (2006) descreveram dois casos de peritonite bacteriana causadas por *Listeria monocytogenes* em pacientes cirróticos.

3.4.2. Contaminação de alimentos e ambientes de processamento por *Listeria monocytogenes*

Altamente adaptável e caracterizada por sua natureza saprófita em plantas e patogênica em animais graças à modulação de fatores de virulência (FOX *et al.*, 2011), *Listeria monocytogenes* é comumente isolada de vários ambientes, incluindo solo, silagem, matéria fecal, água e vegetação (THÉVENOT *et al.*, 2006). Em solos, a sobrevivência desse microrganismo é afetada por fatores edafoclimáticos que, quando favoráveis, possibilitam sua permanência nesse ambiente por longos períodos (LOCATELLI *et al.*, 2013).

A contaminação de águas e efluentes domésticos e industriais por esse patógeno em elevadas quantidades desempenha papel fundamental para transmissão para ecossistemas aquáticos, sendo a provável explicação para sua presença em rios, lagos, mares e lençóis subterrâneos (BUDZIŃSKA *et al.*, 2012). Ambientes rurais são potenciais fontes de *Listeria monocytogenes* e a ocorrência desse patógeno no ambiente correlaciona-se com o nível de normas de higiene adotado nas fazendas (FOX *et al.*, 2009). Portanto, alimentos são

facilmente contaminados na produção primária, de forma direta ou indireta, por meio de contato com solo, água, vegetação e adubo contaminados.

Além de ubíqua em ambientes naturais, essa bactéria tem populações humanas e animais como importantes reservatórios, cuja maior prevalência corresponde a gado bovino em ambiente rural (NIGHTINGALE *et al.*, 2004). Animais, sintomáticos ou não, podem ser fontes de contaminação de *Listeria monocytogenes*, assim como fezes bovinas (KASALICA *et al.*, 2011; HUNT *et al.*, 2012). Em estudo realizado no Brasil, Hofer e Reis (2005) analisaram 246 amostras do gênero *Listeria*, isolados de animais doentes e clinicamente saudáveis, provenientes de três regiões do país, durante o período de 1971 a 2000. Os autores observaram a prevalência de *Listeria* spp. em 93,9% das amostras. Dessas, 88,2% foram provenientes de animais sadios, enquanto o restante (11,7%) originou-se de animais doentes. Também foram encontradas as espécies *Listeria ivanovii* e *Listeria grayi* em fezes e secreção nasal, respectivamente, de bovinos hígidos.

A ocorrência de *Listeria monocytogenes* em inúmeros alimentos de origem animal e vegetal é frequente (SCHÖBITZ *et al.*, 2014), podendo ocorrer ao longo de toda a cadeia produtiva. No caso de vegetais, a contaminação pode ocorrer em estágio pré-colheita, durante a sementeira, e pode ser potencializada por práticas agrícolas que aumentem o risco de contaminação do solo e das culturas, tais como utilização de fezes de animais como adubo ou irrigação com água contaminada (LOCATELLI *et al.*, 2013). A presença desse patógeno em vegetais crus e minimamente processados destinados ao consumo humano já foi demonstrada em várias partes do mundo e ocorre em quantidades mínimas (JEYALETCHUMI *et al.*, 2010).

Por sua vez, em produtos industrializados e produtos prontos para consumo, caracterizados, em sua maioria, por consumo sem cozimento prévio e por longa vida útil sob temperaturas de refrigeração, a contaminação por *Listeria monocytogenes* pode ocorrer em diversos estágios prévios ao consumo, sendo sua presença em níveis elevados reflexo das potenciais fontes de contaminação durante o processamento (LIANOU e SOFOS, 2007). A atribuição desses alimentos a surtos de listeriose é justificada por suas condições favoráveis de multiplicação de *Listeria monocytogenes* que, mesmo presente em baixas contagens iniciais, atingirá população considerável durante armazenamento prolongado sob refrigeração (ILSI, 2005). Leite cru e produtos lácteos são vias comuns de transmissão de *Listeria monocytogenes*, sendo os queijos os produtos mais comumente contaminados. No Brasil, a ampla variação de ocorrência desse patógeno nesse produto alimentício é influenciada por

fatores como uso de diferentes técnicas de detecção da bactéria, variações de padrão de qualidade dos queijos e utilização de leite cru ou pasteurizado como matéria prima (BARANCELLI *et al.*, 2011).

Apesar da presença de baixas contagens de *Listeria monocytogenes* em ambientes de produção primária, a ocasional contaminação ambiental de alimentos por cepas potencialmente virulentas pode ser suficiente para adaptação e posterior estabelecimento dessas em ambientes de processamento, resultando em contaminação disseminada dos alimentos disponíveis ao consumidor (FENLON *et al.*, 1996). Nesses ambientes, a contaminação é resultado da introdução de cepas persistentes, cuja permanência por longos períodos podem contribuir para recorrentes contaminações do produto final e transmissão do patógeno para humanos (FERREIRA *et al.*, 2014). Assim, devido à sua ubiquidade, a eliminação de *Listeria monocytogenes* da cadeia de produção é utópica e sempre estarão presentes possíveis fontes de contaminação.

3.4.3. Medidas de controle para ocorrência de *Listeria monocytogenes* em alimentos

A grande incidência de surtos de listeriose pode ser justificada pela crescente demanda por alimentos prontos para o consumo como consequência da crescente valorização da praticidade, juntamente com o aumento da população suscetível à *Listeria monocytogenes* (ICHIRO SAKATE *et al.*, 2003). Além disso, a elevada frequência de exposição humana à esta bactéria, resultado de sua elevada prevalência em ambientes e alimentos, suscitou questionamentos por parte da indústria quanto à eficiência de medidas adotadas para minimização e inativação da presença de *Listeria monocytogenes* em alimentos e em unidades processadoras de alimentos.

Visando reduzir a contaminação de alimentos por *Listeria monocytogenes*, a indústria de alimentos implantou normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (RAMASWAMY *et al.*, 2007). Objetivando a inocuidade alimentar, os procedimentos de BPF a serem adotados incluem controle e redução da contaminação inicial da matéria prima, redução da contaminação agregada ao produto final durante o processo de embalagem e prevenção do incremento do número de células de *Listeria monocytogenes* remanescentes na fase compreendida entre a embalagem e a preparação do produto para o consumo.

No Brasil, recentemente entrou em vigor a Instrução Normativa 9 (BRASIL, 2009), a qual determina o monitoramento de *Listeria monocytogenes* em todos os produtos prontos para o consumo, caracterizados por valores de pH acima de 4,4, atividade de água maior que 0,92 ou concentração de cloreto de sódio inferior a 10%. O controle oficial estabelece a colheita de amostras dos produtos de origem animal prontos para o consumo e inspeção do seu processo de produção por meio de avaliação de registros. Outras regulamentações sobre o nível de contaminação de *Listeria monocytogenes* em alimentos vigoram em outros países como, por exemplo, nos Estados Unidos, em que a política de tolerância zero estabelece ausência deste microrganismo em 25 gramas de alimentos prontos para consumo. Já em alguns países europeus, o critério microbiológico adotado especifica a presença de até 100 UFC/g de *Listeria monocytogenes*, no momento do consumo, em alimentos prontos para consumo incapazes de suportar o crescimento desta bactéria, e, para alimentos prontos para o consumo, em que o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* pode ocorrer, o critério é de ausência no produto recém elaborado ou de 100 UFC/g no momento do consumo (AWAISHEH, 2010).

O cumprimento desses códigos e regulamentações específicos ocorre para controlar a presença de *Listeria monocytogenes* em alimentos que, em nível industrial, é realizado por meio de diversas medidas, dependendo das características de cada produto. De modo geral, para o controle de *Listeria monocytogenes*, são utilizados tratamentos térmicos em matérias primas e em produtos finais para eliminação da bactéria, processos que evitem ou limitem o crescimento da bactéria no produto, desenvolvimento e aplicação de procedimentos de limpeza e sanitização em superfícies de equipamentos e ambientes para evitar a contaminação cruzada e, por fim, agentes antimicrobianos aprovados que reduzam ou eliminem o microrganismo no produto (BRASIL, 2009). Dentre esses, encontram-se os aditivos químicos que, por serem utilizados de forma indiscriminada, induzem efeitos prejudiciais ao organismo. Uma das alternativas disponíveis para substituição parcial ou total ao uso desses aditivos em alimentos como forma eficiente de inibir bactérias patogênicas e deterioradoras consiste na aplicação de BAL ou de bacteriocinas (RAJA *et al.*, 2009).

As bacteriocinas têm apresentado efeito inibitório contra *Listeria* em carne de porco curada e cozida fatiada (MATARAGAS *et al.*, 2003); salmão defumado (BRILLET *et al.*, 2004; GHALFI *et al.*, 2006); salsichas de frango (SANT'ANNA *et al.*, 2013); carne bovina (BROMBERG *et al.*, 2006); queijo tipo Cottage (DAL BELLO *et al.*, 2012); queijo semi-duro

produzido com leite cru (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001); e leite UAT (Ultra-alta temperatura) (HAN *et al.*, 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (MICROAL) do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.1. Material

4.1.1. Cepas de bactérias lácticas

Foram utilizadas 24 cepas de bactérias lácticas isoladas de grãos de kefir no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM) e identificadas por biologia molecular com uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S no Laboratório de Genética Molecular de Protozoários e Parasitas (LGMPP), ambos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As cepas foram selecionadas segundo sua localidade (cidade) e origem (kefir de leite ou kefir de água), constituindo-se de dez cepas de *Lactobacillus* (*Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus satsumensis*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus diolivorans*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*); oito cepas de *Lactococcus lactis*; cinco cepas de *Leuconostoc mesenteroides*; e uma cepa de *Oenococcus oeni* (Tabela 1).

4.1.2. Cepas indicadoras

As cepas de *Listeria monocytogenes* utilizadas para a avaliação de atividade inibitória estão apresentadas na Tabela 2. Para seleção dessas cepas, adotou-se como critério a incidência de listeriose humana (sorotipo 4b); em alimentos e casos clínicos animais (sorotipo 1/2a); relacionada a espécies animais e ambientais (sorotipo 4a) e uma cepa isolada de salsicha (sem identificação de sorotipo).

Tabela 1: Cepas de bactérias lácticas (BAL) utilizadas neste estudo

ESPÉCIE	FONTE*	CLASSIFICAÇÃO**	CÓDIGO
<i>Lactobacillus casei</i>	ICB/UFMG	KABH	17U
<i>Lactobacillus casei</i> †	ICB/UFMG	KLSA	25P
<i>Lactobacillus diolivorans</i> †	ICB/UFMG	KABH	1Z
<i>Lactobacillus kefir</i>	ICB/UFMG	KLSA	24P3I
<i>Lactobacillus kefiranoferiens</i>	ICB/UFMG	KLDI	8U
<i>Lactobacillus perolens</i>	ICB/UFMG	KASA	11P3
<i>Lactobacillus perolens</i>	ICB/UFMG	KACU	17P2
<i>Lactobacillus mali</i>	ICB/UFMG	KAVI	21U2
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ICB/UFMG	KACU	18P
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ICB/UFMG	KLSA	23P3
<i>Lactococcus lactis</i> †	ICB/UFMG	KACU	1R
<i>Lactococcus lactis</i>	ICB/UFMG	KLCU	3P
<i>Lactococcus lactis</i>	ICB/UFMG	KASA	3R
<i>Lactococcus lactis</i> †	ICB/UFMG	KASA	4R1
<i>Lactococcus lactis</i>	ICB/UFMG	KLCU	5PI
<i>Lactococcus lactis</i> †	ICB/UFMG	KACU	17P3
<i>Lactococcus lactis</i> †	ICB/UFMG	KLSA	22P
<i>Lactococcus lactis</i> †	ICB/UFMG	KLSA	23P2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> †	ICB/UFMG	KLDI	7U
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ICB/UFMG	KLDI	9U2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ICB/UFMG	KLVI	11U1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ICB/UFMG	KLVI	13U2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ICB/UFMG	KLVI	14U
<i>Oenococcus oeni</i> †	ICB/UFMG	KASA	4R2

Abreviaturas: *ICB/UFMG, Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais (Minas Gerais, Brasil). ** KLSA - Kefir de leite de Salvador; KASA - Kefir de água de Salvador; KLCU - Kefir de leite de Curitiba; KACU - Kefir de água de Curitiba; KLVI - Kefir de leite de Viçosa; KAVI - Kefir de água de Viçosa; KABH - Kefir de água de Belo Horizonte; KLDI - Kefir de leite de Divinópolis. † Cepas excluídas devido à ausência/lentidão de crescimento ou contaminação.

Tabela 2: Cepas de *Listeria monocytogenes* utilizadas neste estudo

ESPÉCIE	FONTE*	SOROTIPO	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO
<i>Listeria monocytogenes</i> (sem identificação)	FAT	-	30°C
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC ® 19111 TM	Fiocruz	1/2a	37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC ® 19114 TM	Fiocruz	4a	37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC ® 19115 TM	Fiocruz	4b	37°C

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

4.2. Métodos

4.2.1. Ativação e manutenção das culturas bacterianas

As cepas de bactérias lácticas foram ativadas em MRS caldo (Difco®, Detroit, Michigan, EUA), em concentração 2% (5 µL/ 100 mL). As culturas foram incubadas em

aerobiose, a 37°C, por 24 horas. Após crescimento obtido com a primeira ativação, foram realizadas mais duas ativações.

Para verificação da pureza, as culturas obtidas da terceira ativação foram estriadas por esgotamento em placas contendo MRS ágar (Difco®, Detroit, Michigan, EUA). Posteriormente, foi realizada a coloração de Gram. Foram excluídas do estudo as cepas que apresentaram contaminação ou aquelas com crescimento ausente/lento (Tabela 1).

Para a manutenção das culturas puras, as mesmas foram cultivadas em MRS caldo e incubadas a 37°C, por 24 horas. Posteriormente, alíquotas de 1500 µL foram transferidas para tubos criogênicos e adicionadas de 20% glicerol. Os foram armazenados em ultra-freezer (Revco Scientific, Asheville, North Carolina, EUA), a -80°C.

As cepas de *Listeria monocytogenes* foram cultivadas em BHI caldo (Merck®, Darmstadt, Alemanha), em concentração 2% (5 µL/ 100 mL). As culturas foram incubadas em aerobiose, conforme as temperaturas indicadas na Tabela 2, por 24 horas. Após crescimento obtido com a primeira ativação, foram realizadas mais duas ativações.

Para a manutenção das culturas puras, as mesmas foram cultivadas em BHI caldo (Merck®, Darmstadt, Alemanha) e incubadas em suas respectivas temperaturas, em aerobiose, por 24 horas. Posteriormente, os tubos contendo as culturas puras crescidas foram estocados sob refrigeração, a 4°C.

4.2.1.1. Nisina comercial

Foi utilizado o produto comercial *Nisaplin*®, gentilmente cedido pela DuPont® (Danisco/DuPont, Copenhagen, Dinamarca), cuja formulação contém 25 mg de nisina por grama do produto.

A solução desse produto foi obtida em concentração recomendada pelo fabricante (2,5 mg/mL) e filtrada em membrana de poros de 0,22 µm (Millex®, Inglaterra). Posteriormente, alíquotas de 1500 µL foram transferidas para eppendorfs, os quais foram armazenados em ultra-freezer (Revco Scientific, Asheville, North Carolina, EUA), a -80°C, até o momento de sua utilização.

A nisina foi utilizada nos testes de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços e em placas de microtitulação como controle e como parâmetro de comparação para a atividade apresentada pelos sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) e sobrenadantes filtrados (SF).

4.2.2. Teste de atividade inibitória direta por método *spot-on-lawn*

Após a exclusão das cepas de BAL de crescimento ausente/lento, foram selecionadas 15 bactérias para o teste de atividade inibitória direta. Para esse teste, foi utilizada a técnica de *spot-on-lawn*. Primeiramente, foi vertido MRS ágar sólido em placas, nas quais as cepas de BAL foram inoculadas por picada, com auxílio de um palito estéril, perfazendo um total de oito cepas por placa. Após esta etapa, as placas inoculadas foram incubadas em aerobiose, a 37°C por 24-48 horas, para a formação de botões de crescimento.

Foram utilizados cultivos das 15 cepas de BAL em MRS caldo para se obter a segunda camada, contendo a bactéria reveladora. Alíquotas de 100 µL dos repiques foram diluídas em tubos 5 mL de MRS caldo e, então, alíquotas de 300 µL provenientes desses tubos foram inoculadas em 15 mL de MRS ágar semissólido (0,9%). Esse inóculo foi vertido sobre a primeira camada contendo os botões de crescimento. Após completa solidificação, as placas foram incubadas em aerobiose, a 37°C, por 24 horas. A atividade inibitória das colônias nos pontos de inoculação foi observada quanto à presença de halos de inibição, medidos com auxílio de paquímetro. A cepa de BAL que apresentou, ao mesmo tempo, melhor velocidade de crescimento, maior homogeneidade como céspede e maior sensibilidade em relação às outras BAL foi utilizada como cepa reveladora no teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços. Esse experimento foi realizado em três repetições em triplicata.

4.2.3. Obtenção de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) e de sobrenadantes filtrados (SF)

Para obtenção de sobrenadantes, foram selecionadas as cepas de BAL que apresentaram atividade inibitória por formação de halo no teste de atividade inibitória direta por método *spot-on-lawn* (subitem 4.2.2), com objetivo de testar apenas a ação de substâncias antimicrobianas produzidas por essas bactérias. Assim, foram cultivadas 12 cepas, cada uma em 80 mL de MRS caldo, com incubação em aerobiose, a 37°C, por 24 horas. Após incubação, os cultivos foram centrifugados a 5.000g, a 4°C, por 10 minutos. Para cada cepa, o sobrenadante foi dividido em dois frascos, com igual volume (40 mL). Os valores de pH de ambos os frascos foram mensurados. Em apenas um dos frascos o pH de cada um dos cultivos foi ajustado para 6,2 com solução de NaOH 0,1 M, juntamente com adição de catalase (130 UI/ml), conforme Oliveira (2008), para eliminar a possibilidade de que a inibição direta

observada fosse causada por substâncias inibitórias como ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio. Posteriormente, esses sobrenadantes foram filtrados em membrana de poros de 0,22 µm (Millex®, Inglaterra), obtendo-se, dessa forma, sobrenadantes livres de células, que foram denominados sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF). O conteúdo dos tubos em que o pH não foi ajustado também foi submetido à filtração em membrana. Esses sobrenadantes foram denominados sobrenadantes filtrados (SF). Todos os sobrenadantes foram armazenados em frascos tipo falcon estéreis, a -20°C, para realização dos testes de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços e em placas de microtitulação.

4.2.4. Teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços contra cepa de bactéria láctica reveladora

A atividade antimicrobiana dos SNF e SF obtidos no subitem 4.2.3 foi avaliada pelo teste de difusão em poços (CINTAS *et al.* 1995) contra a cepa de BAL reveladora selecionada no teste de atividade inibitória direta por método *spot-on-lawn* (*Lactobacillus satsumensis* 18P) (subitem 4.2.2). Em placas de Petri (150x15 mm), foram vertidos 60 mL de ágar MRS semissólido (0,9%) contendo 600 µL de inóculo da cepa reveladora. As placas foram armazenadas sob refrigeração por 30 minutos para garantia de completa solidificação do ágar. Com auxílio de um vazador de aço inox esterilizado, foram feitos poços de seis milímetros de diâmetro, perfazendo um total de 13 poços por placa. Cada um dos poços foi preenchido com 50 µL de cada um dos SNF e SF. Como controle, um dos poços foi preenchido com 50 µL de solução estéril de nisina (Nisaplin®, Dupont), em concentração recomendada pelo fabricante (2,5 mg/mL). As placas foram mantidas a 4°C, por 2 horas, para difusão dos sobrenadantes e, em seguida, incubadas em aerobiose, a 37°C, por 24-48 horas. A atividade antimicrobiana de SNF e de SF foi determinada pelo diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos poços, mensurados com auxílio de paquímetro. Este experimento foi realizado em três repetições em triplicata.

4.2.5. Inibição de *Listeria monocytogenes* por sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) e sobrenadantes filtrados (SF)

Os SNF e SF que exibiram atividade inibitória frente às cepas de BAL foram selecionados para os testes de atividade inibitória indireta por difusão em poços e em placas de microtitulação.

4.2.5.1. Teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços

A atividade antimicrobiana dos SNF e SF obtidos no teste de atividade inibitória indireta por método difusão em poços contra a cepa de BAL reveladora (subitem 4.2.3) foi avaliada pelo teste de difusão em poços (CINTAS *et al.* 1995) contra três cepas reveladoras de *Listeria monocytogenes* (*Listeria monocytogenes* isolada de salsicha, *Listeria monocytogenes* sorotipo 1/2a, *Listeria monocytogenes* sorotipo 4a), conduzido conforme método descrito no subitem 4.2.4, com exceção do meio de cultura utilizado para as cepas reveladoras que, neste caso, foi substituído por BHI. A temperatura de incubação foi de 30°C para a cepa de *Listeria monocytogenes* isolada de salsicha e de 37°C para as outras cepas de *Listeria monocytogenes*, conforme recomendação das fundações fornecedoras das cepas. Este experimento foi realizado em três repetições em triplicata.

4.2.5.2. Teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação

Os SNF e SF que apresentaram halos de inibição no teste de atividade inibitória indireta por método difusão em poços (subitem 4.2.4) foram selecionados para verificação de atividade inibitória frente à quatro cepas de *Listeria monocytogenes* (*Listeria monocytogenes* isolada de salsicha, *Listeria monocytogenes* sorotipo 1/2a, *Listeria monocytogenes* sorotipo 4a e *Listeria monocytogenes* sorotipo 4b) em microplacas com 96 orifícios. Os orifícios das placas foram preenchidos com 200 µL de BHI caldo estéril, adotado como branco. Poços adotados como controle foram preenchidos com 150 µL de BHI caldo estéril e 50 µL de cultivo de cada cepa de *Listeria monocytogenes* em concentração de 10² UFC/mL. Nos poços subsequentes, foram adicionadas alíquotas de 50 µL de cultivo de *Listeria monocytogenes* em concentração de 10² UFC/mL, juntamente com 150 µL de cada SNF e também solução de nisina conforme especificada no subitem 4.2.4. As placas foram incubadas a 30°C para a cepa

de *Listeria monocytogenes* isolada de salsicha e a 37°C para as outras cepas de *Listeria monocytogenes*, conforme recomendação das fundações fornecedoras das cepas. As leituras de absorvância foram realizadas em leitora de microplacas (*Versa Max*, Molecular Devices), a 620 nanômetros, nos tempos 0, 4, 8, 12, 24, 28, 32, 36 e 48 horas de incubação.

Para cada tratamento (controle, nisina e SNF) e para cada cepa de *Listeria monocytogenes*, foram mensurados oito valores de absorvância. O mesmo método foi utilizado para avaliar os SF; porém, foram mensurados apenas três valores de absorvância para essas substâncias.

4.2.6. Análise de Dados

Os dados obtidos no teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação, representados pelos valores de absorvância obtidos, foram analisados por Análise de Variância (ANOVA). A comparação das médias obtidas foi realizada por teste de Tukey, em nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Teste de atividade inibitória direta por método *spot-on-lawn* contra cepas de bactérias lácticas

Foram realizados experimentos de triagem pelo método de *spot-on-lawn* com o objetivo de se determinar as cepas de BAL potencialmente mais sensíveis às próprias BAL avaliadas a fim de serem utilizadas como cepas reveladoras. As cepas de *Lactobacillus satsumensis* 18P e *Lactobacillus casei* 17U foram as que se demonstraram maior sensibilidade em relação às BAL testadas.

Na Tabela 3, estão apresentados os valores médios das medidas de halos de inibição, expressos em milímetros. Nas Figuras 1 e 2, estão representadas algumas das BAL testadas contra as cepas 17U e 18P, nas quais é possível observar zonas mais claras ao redor dos botões de crescimento, o que caracteriza atividade inibitória positiva. Na Figura 1, observam-se zonas bem nítidas para os botões de crescimento das cepas 3P, 11U1, 11P3, 17U, 17P2, 18P e 23P3, enquanto que, na Figura 2, essas zonas estão presentes ao redor nos botões das cepas 7U, 9U2, 11U1, 13U2 e 17P2. Por outro lado, cepas que não demonstraram atividade antimicrobiana nesse teste não apresentaram zonas de inibição ao redor dos botões.

Dentre as 15 cepas de BAL testadas, 12 (80%) apresentaram resultados positivos de inibição contra as cepas indicadoras 18P e 17U. Em relação à matriz de cultivo do kefir, a inibição foi observada em 50%, tanto para leite quanto para água. Quanto ao gênero, cinco cepas de *Lactobacillus* (41,6%) e uma de *Lactococcus* (8,3%) foram provenientes de kefir de água; *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, provenientes de kefir de leite, apresentaram porcentagem de inibição de 8,3%, 8,3% e 33,3%, contra as cepas 18P e 17U, respectivamente. Culturas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, oriundas de kefir de água, dentre elas *Lactobacillus perolens* 17P2 e *Lactobacillus perolens* 11P3 foram as que apresentaram os maiores valores numéricos de halos de inibição contra as cepas reveladoras 18P e 17U. As cepas de *Lactobacillus kefir* 24P3I, *Lactobacillus kefirano* 8U e *Lactococcus lactis* 5PI não apresentaram atividade inibitória contra as cepas reveladoras testadas.

Conforme mencionado, a partir dos resultados obtidos nesse teste contra as cepas 18P e 17U, selecionou-se a cepa de BAL reveladora, com a qual foi conduzido o teste posterior. A cepa de *Lactobacillus satsumensis* 18P apresentou, ao mesmo tempo, melhor velocidade de crescimento, maior sensibilidade e maior homogeneidade como sobrecamada em relação à

cepa de *Lactobacillus casei* 17U, e, portanto, foi selecionada como microrganismo indicador para o teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços.

Tabela 3: Valores médios das medidas de halos de inibição (em mm) de cepas de bactérias lácticas em teste de atividade inibitória direta por método *spot-on-lawn* contra *Lactobacillus casei* 17U e *Lactobacillus satsumensis* 18P

CEPAS	CLASSIFICAÇÃO	<i>Lactobacillus casei</i> 17U	<i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P
<i>Lactobacillus casei</i> 17U	KABH	N/R*	6,60
<i>Lactobacillus kefir</i> 24P3I	KLSA	-	-
<i>Lactobacillus kefirano</i> faciens 8U	KLDI	-	-
<i>Lactobacillus perolens</i> 11P3	KASA	8,00	13,30
<i>Lactobacillus perolens</i> 17P2	KACU	11,30	11,60
<i>Lactobacillus mali</i> 21U2	KAVI	6,30	9,16
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P	KACU	6,00	N/R*
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 23P3	KLSA	7,00	8,30
<i>Lactococcus lactis</i> 3P	KLCU	5,60	4,60
<i>Lactococcus lactis</i> 3R	KASA	7,60	6,00
<i>Lactococcus lactis</i> 5PI	KLCU	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 9U2	KLDI	6,00	7,60
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 11U1	KLVI	7,00	7,00
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 13U2	KLVI	8,66	8,00
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 14U	KLVI	7,00	6,00

* N/R: Não realizado.

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



Figura 1: Atividade antimicrobiana de cepas de bactérias lácticas contra *Lactobacillus casei* 17U em teste de atividade inibitória direta por método *spot-on-lawn*.

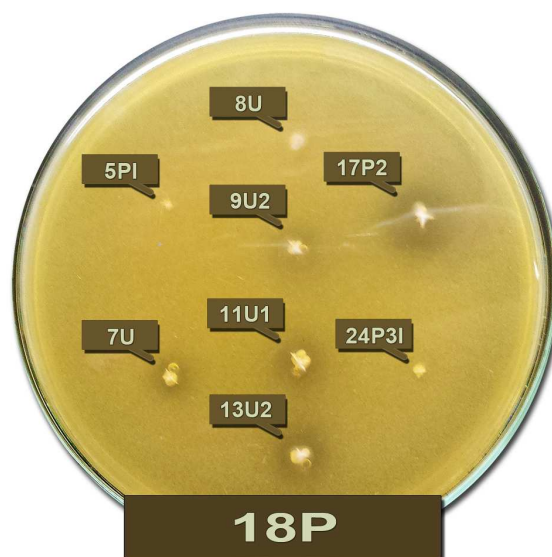


Figura 2: Atividade antimicrobiana de cepas de bactérias lácticas contra *Lactobacillus satsumensis* 18P em teste de atividade inibitória direta por método *spot-on-lawn*.

De acordo com Çadirici e Citak (2005), a técnica de *spot-on-lawn* é, ao mesmo tempo, prática e adequada para pesquisa de atividade antimicrobiana, tendo em mente, contanto, que sua ação inibitória é resultado de diversas substâncias presentes produzidas por bactérias.

A demonstração de atividade antimicrobiana de BAL pela utilização deste método é comumente relatada na literatura. De Martinis *et al.* (2001) confirmaram atividade antagonista de cepas de BAL isoladas de carne e produtos cárneos contra *Listeria monocytogenes* conduzindo ensaio por *spot-on-lawn*. A determinação de atividade antimicrobiana por meio de teste de atividade inibitória direta por método *spot-on-lawn* ocorre por meio da ação direta de células e de substâncias inibitórias produzidas pelas mesmas. No caso de BAL, esses compostos, tais como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, são produzidos durante a fermentação láctica e podem exercer atividade antagonista contra o crescimento de bactérias patogênicas e deterioradoras em alimentos (DARSANAKI *et al.*, 2012). Conforme Santos *et al.* (2003), o efeito inibitório de cepas de *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* contra microrganismos observados em testes *in vitro* pode ser atribuído à secreção de substâncias antimicrobianas, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, entre outras.

Utilizando BAL isoladas de amostras de leite iraniano, Taheri *et al.* (2011) demonstraram atividade inibitória contra os patógenos Gram-negativo e Gram-positivo *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente, por meio desse teste.

Em estudo de De Martinis *et al.* (2001), foi possível demonstrar ação antagonista de cepas de BAL isoladas de produtos cárneos e de carnes provenientes do Brasil por meio da realização de teste por método *spot-on-lawn*.

Similarmente, Furtado (2010), utilizando sobrenadantes de cepas de BAL isoladas de leite de cabra cru, observaram atividade inibitória contra microrganismo controle *Lactobacillus sakei* e cepas de diferentes sorotipos de *Listeria monocytogenes*.

Carasi *et al.* (2014) também demonstraram espectro de ação com cepas puras de *Lactobacillus kefir* isoladas de kefir contra os patógenos Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Enteriditis e *Shigella flexneri* e Gram-positivo *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e, por fim, *Listeria monocytogenes*, utilizando o mesmo método para inibição direta. Portanto, a utilização de *spot-on-lawn* representa um método adequado para triagem de atividade antimicrobiana.

É importante ressaltar que, apesar de específica e constante, a composição microbiológica de kefir pode sofrer variações conforme sua origem e manipulação, o que, conseqüentemente, pode gerar resultados diferentes entre experimentos. Tal fato pode ser comprovado por estudo de Miguel *et al.* (2013). Por meio de análises bioquímica e molecular, os autores avaliaram espécies de leveduras presentes em kefir de diferentes localidades (Brasil, Canadá e Estados Unidos). Observou-se que a composição de leveduras entre essas amostras de kefir sofreram variações que, segundo os autores, pode ser explicada pelo fato de que diferentes grãos de kefir podem conter microbiotas diversas. É possível inferir que esse fato também se aplique às bactérias lácticas presentes em grãos de kefir.

5.2. Teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços contra cepa de bactéria láctica reveladora *Lactobacillus satsumensis* 18P

Conforme mencionado, a partir dos resultados obtidos no teste de atividade inibitória direta por método *spot-on-lawn* contra as cepas 18P e 17U, selecionou-se a cepa de BAL reveladora. A cepa de *Lactobacillus satsumensis* 18P apresentou, ao mesmo tempo, melhor velocidade de crescimento, maior sensibilidade e maior homogeneidade como sobrecamada em relação à cepa de *Lactobacillus casei* 17U, e, portanto, foi selecionada como microrganismo indicador para o teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços.

De modo a eliminar a possibilidade de efeito inibitório demonstrado em teste direto por meio da ação de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, conduziu-se, posteriormente, o teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços. Nesse teste, o sobrenadante obtido da cepa produtora foi neutralizado com ajuste de pH com NaOH e catalase para excluir a ação de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, respectivamente. Desse modo, esse teste depende apenas da atividade de bacteriocina ou de substância similar em questão.

As 12 cepas que apresentaram atividade antimicrobiana no teste de atividade inibitória direta por método *spot-on-lawn* contra *Lactobacillus satsumensis* 18P, selecionada como cepa reveladora no teste anterior, foram utilizadas para obtenção de sobrenadantes filtrados (SF) e de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF), sendo excluídas aquelas que não apresentaram halos de inibição. No teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços, todos os SNF e SF testados demonstraram efeito antagonista contra a cepa de BAL

reveladora *Lactobacillus satsumensis* 18P. Os resultados, apresentados na Tabela 4, estão expressos de forma qualitativa devido à dificuldade de mensuração dos halos observados.

Por meio de observação visual, alguns halos apresentaram-se mais bem definidos e regulares, como o SNF da cepa de *Lactobacillus perolens* 17P2, enquanto outros se revelaram mais discretos, porém nítidos, exemplificados pelo SNF correspondente à cultura 3P (Figura 3).

Tabela 4: Resultado qualitativo de atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) e sobrenadantes filtrados (SF) em teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços contra *Lactobacillus satsumensis* 18P

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

(+) presença de zona de inibição; (-) ausência de zona de inibição.

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

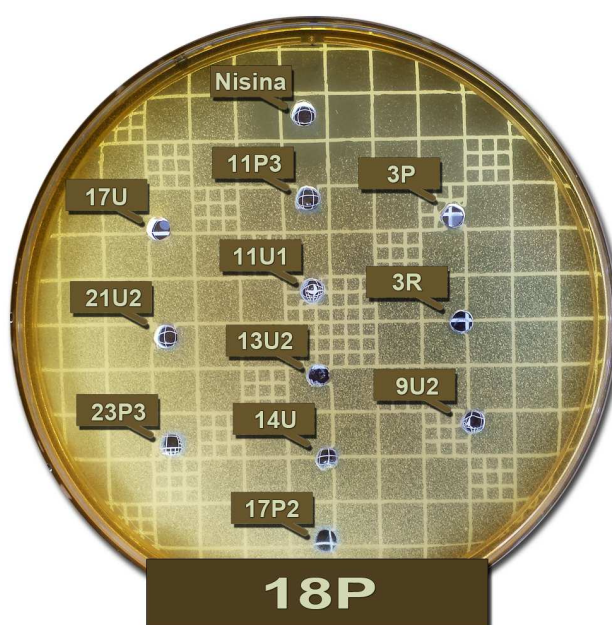


Figura 3: Atividade antimicrobiana de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) em teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços contra *Lactobacillus satsumensis* 18P.

Os valores de pH de sobrenadantes filtrados (SF) e os valores de pH de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) obtidos das cepas de BAL estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de pH de sobrenadantes filtrados e valores de pH de sobrenadantes neutralizados filtrados obtidos de cepas de bactérias lácticas

CEPAS	CLASSIFICAÇÃO	pH SF	pH SNF
<i>Lactobacillus casei</i> 17U	KABH	3,87	6,21
<i>Lactobacillus perolens</i> 11P3	KASA	3,91	6,21
<i>Lactobacillus perolens</i> 17P2	KACU	3,87	6,22
<i>Lactobacillus mali</i> 21U2	KAVI	3,85	6,23
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P	KACU	3,97	6,20
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 23P3	KLSA	3,84	6,20
<i>Lactococcus lactis</i> 3P	KLCU	3,83	6,20
<i>Lactococcus lactis</i> 3R	KASA	3,80	6,20
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 9U2	KLDI	3,82	6,20
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 11U1	KLVI	4,39	6,20
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 13U2	KLVI	3,85	6,20
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 14U	KLVI	3,83	6,20

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

A demonstração de atividade antimicrobiana de cepas de BAL contra outros microrganismos pela realização de testes de inibição indireta pelo método de difusão em ágar é comumente relatada na literatura. Entretanto, estudos demonstram resultados variáveis com o uso de SF e SNF.

De Carvalho *et al.* (2006) conduziram os métodos de inibições direta e indireta, por meio de teste de *spot* e difusão em ágar, com espécies BAL isoladas de salame italiano e obtenção de sobrenadantes filtrados e neutralizados a pH 6,5, respectivamente. Em ambos os testes, os autores observaram que tanto as células de BAL quanto seus sobrenadantes possuíram atividade inibitória contra *Listeria monocytogenes* isoladas de diferentes fontes, apesar da sensibilidade das cepas variarem. No presente estudo, resultados similares foram obtidos com cepas de *Listeria monocytogenes* apresentando sensibilidade variável de acordo com os SNF e SF aplicados.

Em estudo de Tharmaraj e Shah (2009), SF e SNF em pH 6,0 de bactérias probióticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Propionibacterium*, obtidos de diferentes bancos de culturas, foram testados contra microrganismos patogênicos e deterioradores em fondue a base de queijo, incluindo *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Bacillus stearothermophilus*. Os

sobrenadantes não neutralizados produziram zonas de inibição contra os microrganismos testados, porém, os sobrenadantes neutralizados não demonstraram atividade inibitória. A partir desses resultados, os autores concluíram que a substância inibitória pode corresponder a ácido orgânico ou a um grupo dos mesmos ou, ainda, a uma bacteriocina não ativa em pH 6,0.

Rusmana *et al.* (2013) isolaram BAL de peixe fermentado da Indonésia (bekasam) e testaram a atividade de seus SF e SNF a pH 7,0 contra as bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Todos os SF das 53 BAL isoladas demonstraram atividade inibitória contra as cinco bactérias indicadoras, enquanto nenhum dos SNF apresentou inibição. Desse modo, os resultados apresentados por ambos estudos indicam que a ação inibitória contra os microrganismos indicadores ocorreu devido ao conteúdo de ácidos orgânicos.

Por outro lado, Lau e Liang (2014) utilizaram SF e SNF a pH 7,0 de cepas de *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus casei*, *Weissella cibaria* e *Lactobacillus fermentum* para testar a atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis*. Os resultados demonstraram atividade inibitória menos intensa dos SNF em relação aos SF. Esse fato levou os autores a concluir que os principais contribuintes para a ação inibitória observada são os ácidos láctico e acético, no caso dos SF; entretanto, a inibição apresentada pelos SNF corresponde a compostos bioativos de base protéica, possivelmente bacteriocinas.

Em outro estudo de Hor e Liang (2014), SF e SNF a pH 7,0 foram utilizados para demonstraram inibição contra *Staphylococcus aureus*. De modo similar ao estudo anterior, SNF apresentaram menor ação inibitória em relação a SF, novamente indicando contribuição de peptídeos bioativos e de ácidos orgânicos, respectivamente. Portanto, nesses estudos, a ação de SF e, principalmente, de SNF contra microrganismos alvo demonstra possível efeito inibitório de bacteriocinas ou de substâncias similares a bacteriocinas.

Ainda, outros relatos envolvendo a avaliação da atividade inibitória de SNF e SF de BAL de kefir, por meio de diferentes métodos, estão descritos na literatura.

Utilizando uma cepa de *Lactobacillus plantarum* isolada de kefir, Puertollano *et al.* (2009) obtiveram SNF concentrado, cuja atividade antimicrobiana foi avaliada contra diversos patógenos. Os autores observaram que a substância inibiu o crescimento de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, porém não afetou o desenvolvimento de outras bactérias Gram-positivo e leveduras, tais como *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, respectivamente.

Raja *et al.* (2009) avaliaram a atividade inibitória de SNF obtido de *Lactococcus lactis cremoris* isolado de kefir por método de difusão em poços e observaram inibição de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Samonella* spp., dentre outros microrganismos de importância alimentar.

Por sua vez, Dias (2011) também confirmou atividade antimicrobiana de SF e SNF provenientes de cepas de *Lactobacillus* isoladas de kefir contra as bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

Recentemente, estudo realizado por Okda *et al.* (2013) teve como objetivo determinar a atividade antibacteriana de metabólitos de kefir *in vitro* após fermentação sob diferentes condições, incluindo tempo e temperatura de incubação, neutralização e tratamento térmico, contra diversos patógenos de importância alimentar, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes*. Para determinação do efeito de neutralização e tratamento térmico, foram obtidos SNF a pH 6,5, aquecido a 72°C por 15 segundos, e SF, o qual não foi submetido a nenhum tratamento. Após a realização do método de difusão em discos, os autores observaram atividade inibitória significativamente mais intensa para SF em relação a SNF e concluíram que a atividade do primeiro deve-se, provavelmente, à presença de compostos antimicrobianos, tais como bacteriocinas, exopolissacarídeos e peróxido de hidrogênio, produzidos pela microbiota natural de kefir.

As propriedades probióticas de BAL isoladas de kefir estão documentadas (SERVIN, 2004; YÜKSEKDAĞ *et al.*, 2004) e envolvem determinação de resistência a diferentes valores de pH e concentrações de sal, habilidades de adesão, produção de exopolissacarídeos e, por fim, avaliação de atividade antimicrobiana contra patógenos que, por sua vez, é determinada pela produção de diversos metabólitos, como ácidos lático e acético, peróxido de hidrogênio, diacetil, gás carbônico e bacteriocinas ou substâncias similares a bacteriocinas (SABIR *et al.*, 2010).

Dessa forma, a partir dos resultados positivos obtidos com SNF neste trabalho, pode-se inferir que a inibição da cepa de BAL reveladora *Lactobacillus satsumensis* 18P ocorre por substâncias antimicrobianas que não correspondem a ácidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio, mas, possivelmente, a bacteriocinas ou substâncias similares a bacteriocinas.

5.3. Inibição de *Listeria monocytogenes* por sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) e por sobrenadantes filtrados (SF)

5.3.1. Teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços

Os SNF e SF que apresentaram atividade antimicrobiana no teste de atividade inibitória indireta por difusão em poços contra a bactéria reveladora *Lactobacillus satsumensis* 18P foram selecionados para dar continuidade ao teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços contra três cepas de *Listeria monocytogenes* (*Listeria monocytogenes* isolada de salsicha, *Listeria monocytogenes* sorotipo 1/2a e *Listeria monocytogenes* sorotipo 4a). Entretanto, no teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em ágar conduzido com as cepas de *Listeria monocytogenes*, nenhum dos SNF e SF selecionados demonstrou atividade inibitória contra as cepas indicadoras em questão, com exceção da nisina (Figura 4).

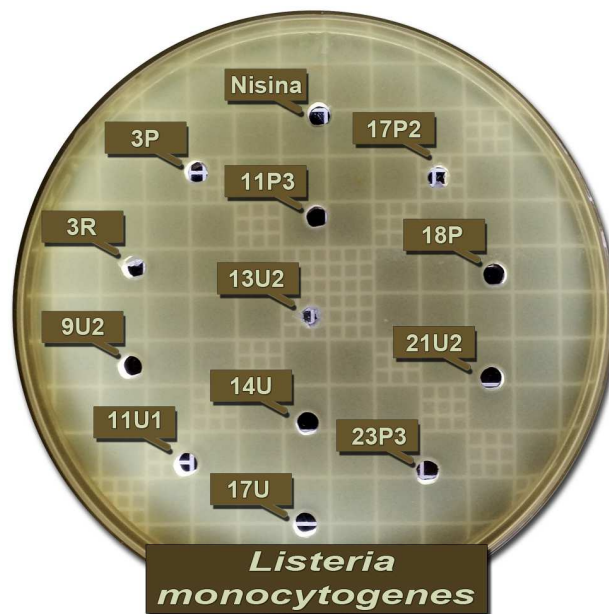


Figura 4: Atividade antimicrobiana de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) em teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços contra *Listeria monocytogenes* isolada de salsicha.

Apesar de comumente utilizado, o método de inibição indireta com base em difusão em ágar possui limitações. Em estudo de Valgas *et al.* (2007), foram avaliados métodos de triagem para determinação de atividade antimicrobiana de produtos naturais com objetivo de avaliar diferentes técnicas de difusão e suas sensibilidades. Segundo os autores, o processo de difusão depende de diversos fatores que incluem número, tamanho e forma das partículas a serem difundidas. O número de partículas é fator de grande influência na taxa de difusão

devido à velocidade de difusão ser diretamente dependente do gradiente de concentração; logo, a difusão ocorre mais rapidamente em maior gradiente de concentração.

Quanto ao tamanho de partículas, a relação é inversamente proporcional, sendo a taxa de difusão facilitada por partículas de pequeno volume e dificultada com as de grande volume, respectivamente. Ainda, a difusividade é afetada por fatores como temperatura e tempo, respectivamente, devido à energia cinética de moléculas e distância atingida por difusão. Também, outros possíveis fatores e interações, tais como polaridade e pH, podem interferir positiva ou negativamente na taxa de difusão. Além das possíveis limitações descritas, a baixa concentração dos sobrenadantes também pode ser fator impeditivo para detecção de atividade inibitória dessas substâncias por métodos de difusão (SAVINO *et al.*, 2011). Portanto, métodos de difusão nem sempre representam a melhor opção de escolha para avaliação de atividade antimicrobiana.

Estudos demonstram a ineficiência do método de difusão em poços em detectar atividade antimicrobiana de sobrenadantes contra microrganismos alvo, corroborando com as conclusões de Valgas *et al.* (2007). Hema *et al.* (2011) examinaram três cepas de *Lactobacillus* quanto à capacidade inibitória contra bactérias Gram-negativo por meio dos métodos de *spot-on-lawn* e difusão em poços. Os autores verificaram que os valores de halos de inibição atingidos pelo teste de atividade inibitória direta foram maiores quando comparados com aqueles obtidos por inibição indireta e concluíram que o método *spot-on-lawn* apresenta diversas vantagens em relação ao de difusão em poços quanto à eficiência de inibição e facilidade de aplicação.

Similarmente, Çadirici e Citak (2005) utilizaram os mesmos métodos, de modo comparativo, para avaliação de atividade antagonista de BAL contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. Os resultados obtidos demonstram que BAL com inibição satisfatória contra microrganismo alvo no método *spot-on-lawn* não demonstraram atividade intensa durante o ensaio por difusão. A partir deste fato, os autores concluíram que, para a condução de testes para avaliação de atividade inibitória, a primeira técnica é a mais adequada por considerar o efeito de diversos metabólitos. Entretanto, quando o objetivo é investigar a ação de bacteriocinas, aconselha-se o uso do método de difusão como controle.

Como alternativa às limitações apresentadas pelo teste de difusão em ágar para avaliação da atividade inibitória dos sobrenadantes obtidos, optou-se por avaliar a atividade antimicrobiana dessas substâncias pelo método de microtitulação em placas. A preferência por técnicas de microtitulação em detrimento do método de difusão em ágar é uma tendência

confirmada por Kreander *et al.* (2005). Segundo esses autores, esse último método, tradicionalmente utilizado para rastreamento de atividade antimicrobiana, apresenta baixo rendimento e limitações inerentes à própria técnica, que podem ser minimizados quando conduzidos por microtitulação em placas, ensaio no qual o efeito antimicrobiano de compostos pode ser mensurado em função do tempo e crescimento bacteriano por medições de absorvância ou pelo uso de corantes indicadores.

5.3.2. Teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação

Os resultados obtidos por microtitulação em placas com SNF estão apresentados nas Tabelas 6 a 9. Durante as primeiras 12 horas do experimento, os valores de absorvância dos controles para as quatro cepas de *Listeria monocytogenes* mantiveram-se baixos, indicando baixa taxa de multiplicação celular. O aumento desses valores pode ser observado a partir da 24^a hora, sendo mantidos até, aproximadamente, a 30^a hora; esse período representa, portanto, crescimento celular do patógeno. Por fim, já na 48^a hora, os valores de absorvância referentes ao controle entram em declínio, o que caracteriza morte celular.

Paralelamente, observa-se que os valores de absorvância dos SNF testados permanecem reduzidos durante as 12 primeiras horas. Com o passar do tempo, esses valores aumentam gradativamente, com maior ou menor intensidade, até a 48^a hora para todas as cepas. Paralelamente, os valores de absorvância apresentados pela nisina demonstram-se relativamente constantes ao longo do tempo, indicando a que essa substância é capaz de inibir, de forma constante, a multiplicação de *Listeria monocytogenes*. É importante ressaltar que, apesar dessa representação descrever, de modo aproximado, o perfil exibido pelas cepas de *Listeria monocytogenes*, as mesmas expressam diferentes níveis de sensibilidade para os SNF aplicados.

Para a cepa de *Listeria monocytogenes* isolada de salsicha, conforme observado na Tabela 6, os valores de absorvância dos SNF apresentam-se iguais aos do controle durante as primeiras 12 horas. Entre 24 e 30 horas, os valores de absorvância dos SNF apresentam-se inferiores ($p < 0,05$) aos valores de absorvância do controle, indicando inibição de crescimento do patógeno. Já na 48^a hora, os valores de absorvância dos SNF exibem-se iguais aos do controle, com exceção de 23P3, cujo valor encontra-se maior. Quando são comparados os valores de absorvância dos SNF com os de nisina, observa-se que, até a 12^a hora, os primeiros apresentam-se inferiores ou iguais aos da bacteriocina. Entre a 24^a e 30^a hora, os valores de absorvância dos SNF encontram-se maiores ou iguais aos da nisina, exceto para 3R e 9U2

que, na 24^a hora, apresentam-se inferiores ($p < 0,05$). Contudo, na 48^a hora, todos os valores de absorvância dos SNF encontram-se superiores aos da nisina.

O perfil apresentado por *Listeria monocytogenes* 1/2a diverge da cepa anterior (Tabela 7). Durante as primeiras 12 horas, os valores de absorvância exibidos pelos SNF são iguais ou inferiores aos do controle. De 24 a 48 horas, os valores de absorvância dos SNF encontram-se inferiores ($p < 0,05$) aos do controle, exceto para 23P3 que apresenta valor de absorvância igual ao do controle no tempo 48. Já em relação à nisina, todos os SNF apresentaram valores de absorvância inferiores ($p < 0,05$) entre 0 e 30 horas. Já na 48^a hora, os valores de absorvância dos SNF encontram-se iguais aos da nisina, com exceção de 21U2 e 23P3, os quais apresentam valores de absorvância superiores aos da bacteriocina.

Por sua vez, o comportamento exibido por *Listeria monocytogenes* 4a é semelhante ao da cepa 1/2a, como pode ser observado na Tabela 8. Durante o período compreendido entre 0 a 12 horas, os valores de absorvância dos SNF encontram-se iguais aos do controle, exceto para a 8^a hora. Já no período entre 24 e 30 horas, esses valores apresentam-se inferiores ($p < 0,05$) aos do controle. Na 48^a hora, contudo, observa-se que os apenas SNF 9U2 exibe valores de absorvância inferiores ($p < 0,05$) aos do controle, enquanto que o restante dos SNF, com exceção de 21U2 e 23P3, exibe valores de absorvância iguais aos do controle. Ao se comparar com nisina, os valores de absorvância dos SNF apresentam-se inferiores ou iguais aos da bacteriocina no período entre 0 e 30 horas, enquanto que, às 48 horas, esses valores encontram-se iguais, exceto para 21U2 e 23P3, os quais apresentam-se superiores.

Por fim, para *Listeria monocytogenes* 4b (Tabela 9), observa-se que, durante as 12 primeiras horas, todos os SNF exibem valores de absorvância iguais aos do controle, enquanto que, no período compreendido entre 24 e 30 horas, esses valores apresentam-se inferiores ($p < 0,05$) aos do controle, com exceção de 17U, o qual se apresenta igual às 30 horas. Já na 48^a hora, a situação apresenta-se invertida, com todos os SNF apresentando valores de absorvância superiores aos do controle, exceto para 3R e 9U2, os quais apresentam-se iguais. Quando comparados com nisina, os valores de absorvância dos SNF encontram-se iguais aos da bacteriocina até o período de 12 horas, e inferiores ($p < 0,05$) ou iguais entre o período compreendido entre 24 e 30 horas, exceto para 17U às 30 horas. Por outro lado, na 48^a hora, os valores de absorvância apresentam-se superiores aos da nisina, com exceção de 9U2, o qual apresenta-se igual.

Em resumo, observa-se que, dentre os SNF avaliados, os SNF correspondentes às cepas de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 e *Lactococcus lactis* 3R apresentaram os maiores

efeitos antagonistas, de modo constante, para todas as cepas de *Listeria monocytogenes* - exceto para *Listeria monocytogenes* 4a às 8 horas - e, em alguns casos, ação similar à da nisina quando observados os valores de absorvância.

Resultados semelhantes aos do presente trabalho foram relatados por Trias *et al.* (2008) e Dal Bello *et al.* (2012).

No primeiro estudo, os autores tiveram como objetivo caracterizar os mecanismos de ação de cepas de *Leuconostoc* em alimentos e determinar seu potencial de aplicação. A partir de frutas frescas e legumes, cepas de *Leuconostoc* foram isoladas, identificadas e posteriormente cultivadas em MRS para obtenção de SNF. As substâncias obtidas foram submetidas a teste de microtitulação em placas para avaliação de atividade contra diversos microrganismos, dentre eles *Listeria monocytogenes*. A ação inibitória observada contra esse patógeno foi atribuída a compostos de natureza protéica, de ação bacteriolítica, que se revelaram bacteriocinas similares à mesentericina e, possivelmente, pertencentes à Classe IIa.

Já no segundo estudo, cepas bacteriocinogênicas de *Lactococcus lactis*, isoladas de alimentos italianos fermentados, foram, inicialmente, submetidas a diversos testes físicos e bioquímicos para identificação das cepas com maior potencial de aplicação como culturas iniciadoras para produção de queijo sendo que, dessas, quatro apresentaram os critérios tecnológicos desejáveis. Essas cepas bacteriocinogênicas foram, então, aplicadas em queijo Cottage com objetivo de controlar o crescimento de *Listeria monocytogenes*. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que as bacteriocinas produzidas por essas cepas de *Lactococcus lactis* possuíam habilidade, em maior ou menor extensão, para controlar o crescimento de *Listeria monocytogenes* durante a produção e armazenamento de queijo tipo Cottage.

Os valores de absorvância apresentados por SNF permitem compor curvas de crescimento (Figuras 5 a 8), nas quais se observa que a ação de SNF frente à todas as cepas de *Listeria monocytogenes* ocorre por meio de retardamento da fase de adaptação e diminuição de taxa de multiplicação celular durante fase exponencial. Contudo, tal ação é limitada, uma vez que, na 24ª hora, os valores de absorvância dos SNF começam a elevar-se e, já na 48ª hora, esses valores encontram-se iguais ou superiores aos do controle para as cepas de *Listeria monocytogenes* isolada de salsicha, 4a e 4b. Portanto, pode-se inferir que o efeito dos SNF exercido frente ao patógeno é bacteriostático. De modo análogo, observando-se o comportamento exibido pela nisina, pode-se inferir que seu efeito é bactericida (DELVIS-BROUGHTON, 2005).

Tabela 6: Valores médios de absorvância para atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) por período de incubação contra cepa de *Listeria monocytogenes* isolada de salsicha em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação

SNF	TEMPO (h)							
	0	4	8	12	24	28	30	48
Controle	0,0620 ^a	0,0596 ^{ab}	0,0598 ^{ab}	0,0609 ^{ab}	0,3327 ^c	0,3862 ^e	0,4010 ^e	0,3366 ^{bcde}
Nisina	0,0886 ^a	0,1042 ^b	0,1130 ^b	0,1138 ^b	0,1305 ^b	0,1399 ^{abc}	0,1383 ^a	0,1480 ^a
<i>Lactobacillus casei</i> 17U	0,0284 ^a	0,0286 ^{ab}	0,0304 ^a	0,0292 ^a	0,0728 ^{ab}	0,1837 ^{bc}	0,2352 ^{cd}	0,3446 ^{bcde}
<i>Lactobacillus perolens</i> 11P3	0,0316 ^a	0,0336 ^{ab}	0,0325 ^{ab}	0,0336 ^{ab}	0,0665 ^{ab}	0,1701 ^{abc}	0,2274 ^{bcd}	0,3471 ^{cde}
<i>Lactobacillus perolens</i> 17P2	0,0302 ^a	0,0295 ^{ab}	0,0297 ^a	0,0293 ^a	0,0764 ^{ab}	0,1977 ^{cd}	0,2544 ^{cd}	0,3445 ^{bcde}
<i>Lactobacillus mali</i> 21U2	0,0319 ^a	0,0333 ^{ab}	0,0307 ^a	0,0312 ^a	0,0747 ^{ab}	0,2023 ^{cd}	0,2580 ^{cd}	0,3516 ^{cde}
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P	0,0210 ^a	0,0220 ^{ab}	0,0209 ^a	0,0210 ^a	0,0714 ^{ab}	0,2010 ^{cd}	0,2575 ^{cd}	0,3940 ^{ef}
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 23P3	0,0278 ^a	0,0278 ^{ab}	0,0269 ^a	0,0272 ^a	0,0830 ^{ab}	0,2687 ^d	0,2812 ^d	0,4727 ^f
<i>Lactococcus lactis</i> 3P	0,0188 ^a	0,0174 ^a	0,0191 ^a	0,0179 ^a	0,0494 ^{ab}	0,1351 ^{abc}	0,1760 ^{abc}	0,3093 ^{bcd}
<i>Lactococcus lactis</i> 3R	0,0241 ^a	0,0245 ^{ab}	0,0241 ^a	0,0246 ^a	0,0373 ^a	0,0893 ^a	0,1197 ^a	0,2632 ^b
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 9U2	0,0209 ^a	0,0196 ^a	0,0202 ^a	0,0210 ^a	0,0429 ^a	0,1092 ^{ab}	0,1496 ^{ab}	0,2708 ^{bc}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 11U1	0,0309 ^a	0,0304 ^{ab}	0,0317 ^{ab}	0,0311 ^a	0,0687 ^{ab}	0,1847 ^{bc}	0,2393 ^{cd}	0,3637 ^{de}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 13U2	0,0282 ^a	0,0288 ^{ab}	0,0286 ^a	0,0294 ^a	0,0558 ^{ab}	0,1393 ^{abc}	0,1852 ^{abc}	0,3025 ^{bcd}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 14U	0,0210 ^a	0,0211 ^a	0,0212 ^a	0,0217 ^a	0,0607 ^{ab}	0,1698 ^{abc}	0,2261 ^{bcd}	0,3259 ^{bcde}

Valores com letras sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem ($p < 0,05$).

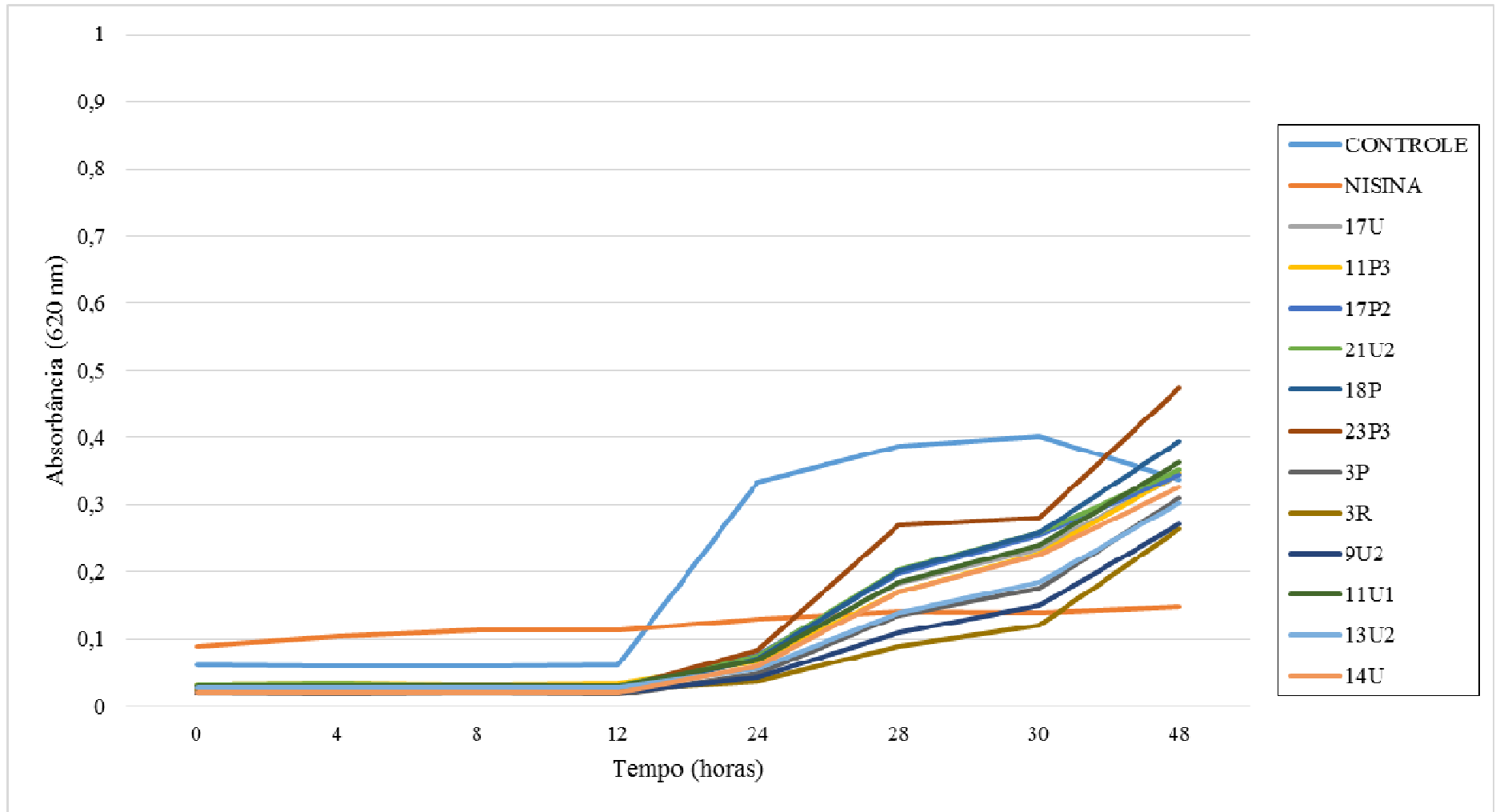


Figura 5: Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* isolada de salsicha e atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.

Tabela 7: Valores médios de absorvância para atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) por período de incubação contra cepa de *Listeria monocytogenes* 1/2a em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação

SNF	TEMPO (h)							
	0	4	8	12	24	28	30	48
Controle	0,0637 ^{ab}	0,0665 ^{bc}	0,0648 ^{bc}	0,0632 ^a	0,1786 ^b	0,4415 ^c	0,4229 ^c	0,2864 ^f
Nisina	0,0908 ^b	0,1044 ^c	0,1086 ^c	0,1126 ^b	0,1499 ^b	0,1507 ^b	0,1511 ^b	0,1597 ^{abcd}
<i>Lactobacillus casei</i> 17U	0,0266 ^a	0,0272 ^{ab}	0,0277 ^{ab}	0,0278 ^a	0,0296 ^a	0,0308 ^a	0,0353 ^a	0,1849 ^{bede}
<i>Lactobacillus perolens</i> 11P3	0,0294 ^a	0,0308 ^{ab}	0,0319 ^{ab}	0,0317 ^a	0,0323 ^a	0,0304 ^a	0,0319 ^a	0,1512 ^{abc}
<i>Lactobacillus perolens</i> 17P2	0,0265 ^a	0,0268 ^{ab}	0,0264 ^{ab}	0,0277 ^a	0,0281 ^a	0,0291 ^a	0,0323 ^a	0,1930 ^{cde}
<i>Lactobacillus mali</i> 21U2	0,0294 ^a	0,0292 ^{ab}	0,0287 ^{ab}	0,0436 ^a	0,0345 ^a	0,0307 ^a	0,0327 ^a	0,2236 ^e
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P	0,0182 ^a	0,0207 ^{ab}	0,0196 ^{ab}	0,0198 ^a	0,0221 ^a	0,0256 ^a	0,0273 ^a	0,2040 ^{de}
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 23P3	0,0253 ^a	0,0270 ^{ab}	0,0257 ^{ab}	0,0262 ^a	0,0265 ^a	0,0296 ^a	0,0317 ^a	0,3193 ^f
<i>Lactococcus lactis</i> 3P	0,0168 ^a	0,0161 ^a	0,0159 ^a	0,0190 ^a	0,0163 ^a	0,0166 ^a	0,0187 ^a	0,1252 ^a
<i>Lactococcus lactis</i> 3R	0,0227 ^a	0,0221 ^{ab}	0,0225 ^{ab}	0,0229 ^a	0,0232 ^a	0,0226 ^a	0,0232 ^a	0,1167 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 9U2	0,0193 ^a	0,0194 ^{ab}	0,0194 ^{ab}	0,0207 ^a	0,0211 ^a	0,0225 ^a	0,0249 ^a	0,1595 ^{abcd}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 11U1	0,0274 ^a	0,0274 ^{ab}	0,0273 ^{ab}	0,0281 ^a	0,0288 ^a	0,0301 ^a	0,0337 ^a	0,1880 ^{bcde}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 13U2	0,0259 ^a	0,0261 ^{ab}	0,0265 ^{ab}	0,0279 ^a	0,0278 ^a	0,0270 ^a	0,0278 ^a	0,1418 ^{ab}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 14U	0,0205 ^a	0,0205 ^{ab}	0,0201 ^{ab}	0,0210 ^a	0,0216 ^a	0,0221 ^a	0,0258 ^a	0,1617 ^{abcd}

Valores com letras sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem ($p < 0,05$).

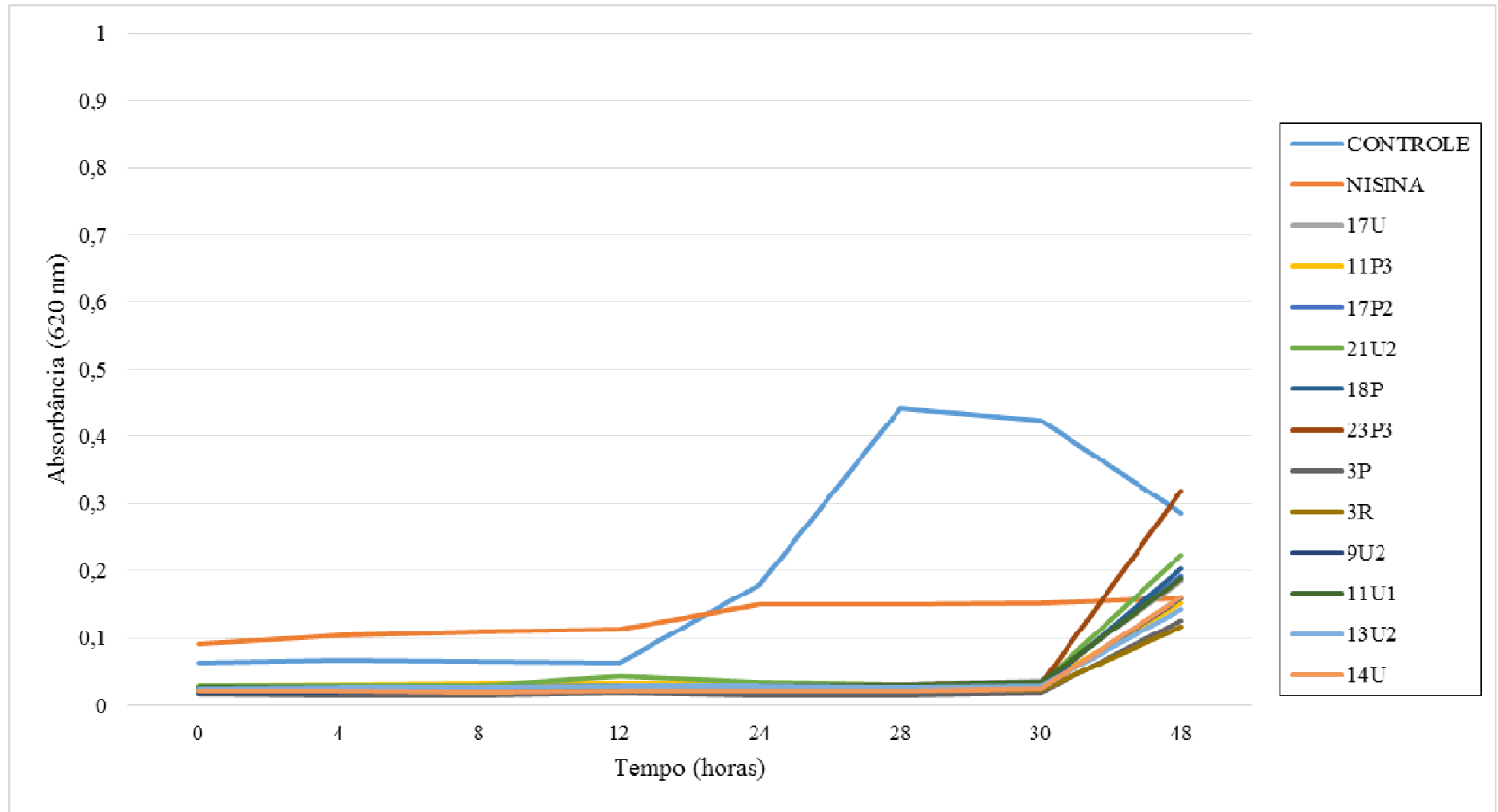


Figura 6: Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* 1/2a e atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.

Tabela 8: Valores médios de absorvância para atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) por período de incubação contra cepa de *Listeria monocytogenes* 4a em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação

SNF	TEMPO (h)							
	0	4	8	12	24	28	30	48
Controle	0,0634 ^a	0,0628 ^{ab}	0,0639 ^a	0,0629 ^{ab}	0,4364 ^c	0,4111 ^d	0,3948 ^d	0,1841 ^b
Nisina	0,0830 ^a	0,0977 ^b	0,0989 ^{ab}	0,1030 ^b	0,1358 ^b	0,1392 ^{abc}	0,1379 ^{abc}	0,1484 ^{ab}
<i>Lactobacillus casei</i> 17U	0,0267 ^a	0,0273 ^{ab}	0,2141 ^{def}	0,0284 ^{ab}	0,0619 ^{ab}	0,1892 ^c	0,2118 ^c	0,1453 ^{ab}
<i>Lactobacillus perolens</i> 11P3	0,0298 ^a	0,0333 ^{ab}	0,2530 ^{ef}	0,0324 ^{ab}	0,0522 ^a	0,1206 ^{abc}	0,1582 ^{abc}	0,1193 ^{ab}
<i>Lactobacillus perolens</i> 17P2	0,0277 ^a	0,0286 ^{ab}	0,1831 ^{cde}	0,0290 ^{ab}	0,0606 ^{ab}	0,1604 ^{abc}	0,1736 ^{abc}	0,1783 ^b
<i>Lactobacillus mali</i> 21U2	0,0312 ^a	0,0298 ^{ab}	0,1381 ^{abcd}	0,0332 ^{ab}	0,0666 ^{ab}	0,1750 ^{bc}	0,1778 ^{abc}	0,2880 ^c
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P	0,0208 ^a	0,0207 ^{ab}	0,1572 ^{bcd}	0,0242 ^a	0,0591 ^{ab}	0,1820 ^c	0,1820 ^{abc}	0,1711 ^{ab}
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 23P3	0,0257 ^a	0,0280 ^{ab}	0,1244 ^{abc}	0,0293 ^{ab}	0,0656 ^{ab}	0,1938 ^c	0,2005 ^{bc}	0,2827 ^c
<i>Lactococcus lactis</i> 3P	0,0168 ^a	0,0169 ^a	0,0793 ^{ab}	0,0192 ^a	0,0336 ^a	0,0965 ^a	0,1265 ^{ab}	0,1150 ^{ab}
<i>Lactococcus lactis</i> 3R	0,0229 ^a	0,0261 ^{ab}	0,1300 ^{abc}	0,0262 ^{ab}	0,0359 ^a	0,0849 ^a	0,1141 ^a	0,1116 ^{ab}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 9U2	0,0192 ^a	0,0214 ^{ab}	0,2640 ^f	0,0215 ^a	0,0410 ^a	0,1012 ^{ab}	0,1446 ^{abc}	0,0978 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 11U1	0,0279 ^a	0,0291 ^{ab}	0,2747 ^f	0,0300 ^{ab}	0,0478 ^a	0,1187 ^{abc}	0,1654 ^{abc}	0,1289 ^{ab}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 13U2	0,0263 ^a	0,0322 ^{ab}	0,2358 ^{ef}	0,0274 ^{ab}	0,0442 ^a	0,1016 ^{ab}	0,1320 ^{ab}	0,1212 ^{ab}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 14U	0,0194 ^a	0,0213 ^{ab}	0,2152 ^{def}	0,0210 ^a	0,0461 ^a	0,1206 ^{abc}	0,1604 ^{abc}	0,1403 ^{ab}

Valores com letras sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem ($p < 0,05$).

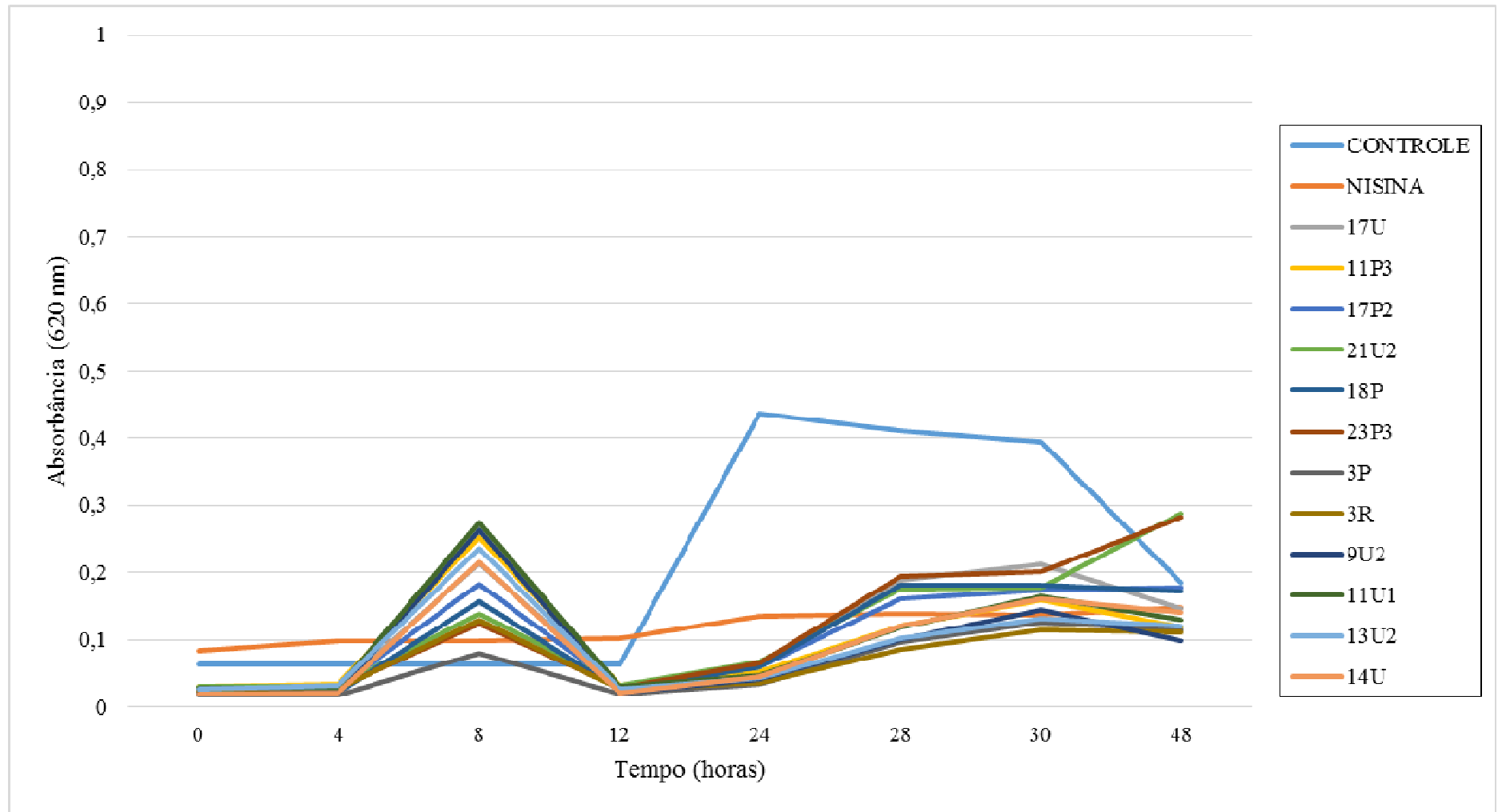


Figura 7: Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* 4a e atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.

Tabela 9: Valores médios de absorvância para atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) por período de incubação contra cepa de *Listeria monocytogenes* 4b em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação

SNF	TEMPO (h)							
	0	4	8	12	24	28	30	48
Controle	0,0628 ^a	0,0639 ^a	0,0646 ^a	0,0621 ^a	0,3938 ^c	0,3810 ^e	0,3614 ^e	0,1593 ^{ab}
Nisina	0,0756 ^a	0,0872 ^a	0,0918 ^a	0,0964 ^a	0,1301 ^b	0,1311 ^{abcd}	0,1321 ^{abc}	0,1438 ^a
<i>Lactobacillus casei</i> 17U	0,0281 ^a	0,0271 ^a	0,0274 ^a	0,0289 ^a	0,0521 ^{ab}	0,2206 ^d	0,2726 ^{de}	0,4587 ^{ef}
<i>Lactobacillus perolens</i> 11P3	0,0302 ^a	0,0321 ^a	0,0317 ^a	0,0326 ^a	0,0384 ^{ab}	0,0905 ^{abc}	0,1149 ^{ab}	0,3196 ^{cd}
<i>Lactobacillus perolens</i> 17P2	0,0286 ^a	0,0311 ^a	0,0289 ^a	0,0340 ^a	0,0444 ^{ab}	0,1530 ^{bcd}	0,1995 ^{bcd}	0,4581 ^{ef}
<i>Lactobacillus mali</i> 21U2	0,0283 ^a	0,0301 ^a	0,0290 ^a	0,0301 ^a	0,0395 ^{ab}	0,1086 ^{abc}	0,1353 ^{abc}	0,6341 ^g
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P	0,0191 ^a	0,0198 ^a	0,0201 ^a	0,0212 ^a	0,0349 ^{ab}	0,1631 ^{cd}	0,2233 ^{cd}	0,5310 ^f
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 23P3	0,0249 ^a	0,0263 ^a	0,0257 ^a	0,0290 ^a	0,0488 ^{ab}	0,1611 ^{cd}	0,2189 ^{cd}	0,9083 ^h
<i>Lactococcus lactis</i> 3P	0,0209 ^a	0,0189 ^a	0,0185 ^a	0,0202 ^a	0,0229 ^a	0,0410 ^a	0,0682 ^a	0,2650 ^c
<i>Lactococcus lactis</i> 3R	0,0217 ^a	0,0245 ^a	0,0266 ^a	0,0266 ^a	0,0260 ^a	0,0464 ^a	0,0682 ^a	0,2427 ^{bc}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 9U2	0,0202 ^a	0,0206 ^a	0,0201 ^a	0,0212 ^a	0,0267 ^a	0,0562 ^{ab}	0,0793 ^a	0,2311 ^{abc}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 11U1	0,0282 ^a	0,0278 ^a	0,0324 ^a	0,0303 ^a	0,0317 ^a	0,0614 ^{ab}	0,0819 ^a	0,2978 ^{cd}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 13U2	0,0265 ^a	0,0267 ^a	0,0281 ^a	0,0291 ^a	0,0333 ^{ab}	0,0668 ^{abc}	0,0932 ^a	0,2939 ^{cd}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 14U	0,0198 ^a	0,0206 ^a	0,0201 ^a	0,0213 ^a	0,0295 ^a	0,0966 ^{abc}	0,1373 ^{abc}	0,3682 ^{de}

Valores com letras sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem ($p < 0,05$).

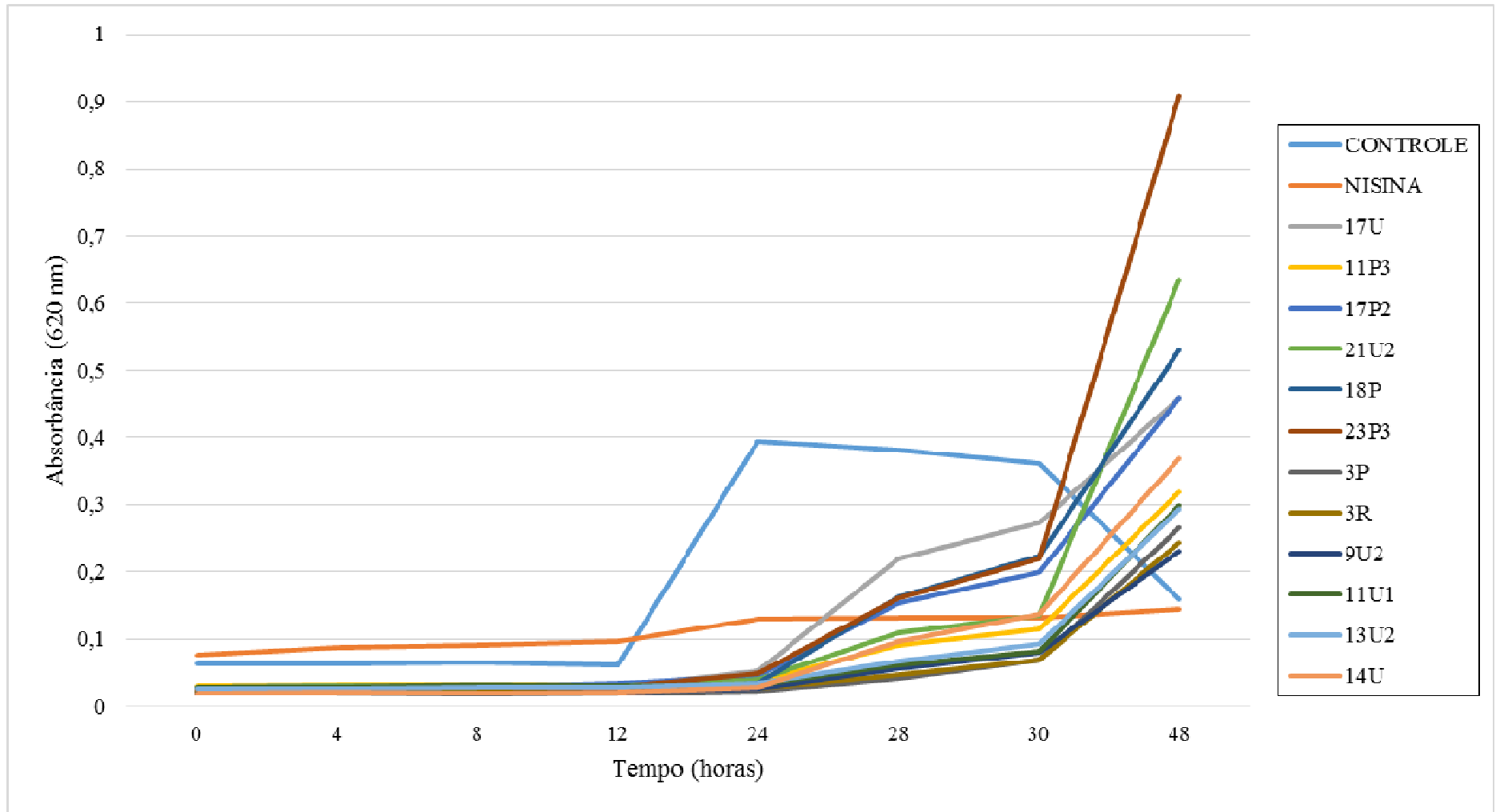


Figura 8: Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* 4b e atividade inibitória de sobrenadantes neutralizados filtrados (SNF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.

Os resultados obtidos por microtitulação em placas com SF estão apresentados nas Tabelas 10 a 13 e Figuras 9 a 12. Durante as primeiras 12 horas, os valores de absorvância dos SF são inferiores ($p < 0,05$) ou iguais aos do controle. Já no período compreendido entre 24 a 48 horas, os valores apresentados pelos SF apresentam-se inferiores em relação aos do controle ($p < 0,05$). Já em relação à nisina, observa-se que os valores de absorvância dos SNF são inferiores ($p < 0,05$) ou iguais aos da bacteriocina ao longo de todo o período considerado.

O efeito inibitório dos SF ocorre de modo contínuo, com inibição de multiplicação celular de *Listeria monocytogenes* ao longo de todo o período observado e é, provavelmente, resultado do efeito sinérgico entre ácidos, peróxido de hidrogênio e outros metabólitos com atividade antimicrobiana e, portanto, difere do comportamento apresentado pelos SNF.

É importante ressaltar que, apesar de não demonstrar valores de absorvância estatisticamente diferentes em relação aos SF avaliados, o SF correspondente à cepa de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 exibe os menores valores numéricos entre essas substâncias na 24^a hora para duas cepas de *Listeria monocytogenes* - isolada de salsicha e 1/2a - e na 48^a hora para três cepas do patógeno - isolada de salsicha, 1/2a e 4a.

Tabela 10: Valores médios de absorvância para atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) por período de incubação contra cepa de *Listeria monocytogenes* isolada de salsicha em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação

SF	TEMPO (h)								
	0	4	8	12	24	28	32	36	48
Controle	0,0616 ^a	0,0622 ^a	0,0627 ^a	0,0863 ^b	0,6811 ^b	0,6170 ^b	0,6350 ^c	0,6486 ^c	0,6261 ^b
Nisina	0,0443 ^a	0,0437 ^a	0,0434 ^a	0,0436 ^a	0,0439 ^a	0,0540 ^a	0,0842 ^b	0,0823 ^b	0,0786 ^a
<i>Lactobacillus casei</i> 17U	0,0397 ^a	0,0365 ^a	0,0375 ^a	0,0528 ^a	0,0406 ^a	0,0380 ^a	0,0400 ^a	0,0444 ^{ab}	0,0422 ^a
<i>Lactobacillus perolens</i> 11P3	0,0656 ^a	0,0473 ^a	0,0471 ^a	0,0458 ^a	0,0442 ^a	0,0451 ^a	0,0458 ^a	0,0453 ^{ab}	0,0483 ^a
<i>Lactobacillus perolens</i> 17P2	0,0458 ^a	0,0459 ^a	0,0438 ^a	0,0422 ^a	0,0476 ^a	0,0504 ^a	0,0525 ^a	0,0546 ^{ab}	0,0579 ^a
<i>Lactobacillus mali</i> 21U2	0,0376 ^a	0,0362 ^a	0,0358 ^a	0,0353 ^a	0,0398 ^a	0,0410 ^a	0,0395 ^a	0,0444 ^{ab}	0,0460 ^a
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P	0,0303 ^a	0,0297 ^a	0,0262 ^a	0,0268 ^a	0,0280 ^a	0,0337 ^a	0,0306 ^a	0,0326 ^a	0,0334 ^a
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 23P3	0,0330 ^a	0,0329 ^a	0,0297 ^a	0,0353 ^a	0,0309 ^a	0,0332 ^a	0,0331 ^a	0,0337 ^{ab}	0,0350 ^a
<i>Lactococcus lactis</i> 3P	0,0389 ^a	0,0312 ^a	0,0303 ^a	0,0328 ^a	0,0299 ^a	0,0329 ^a	0,0354 ^a	0,0338 ^{ab}	0,0344 ^a
<i>Lactococcus lactis</i> 3R	0,0367 ^a	0,0327 ^a	0,0285 ^a	0,0282 ^a	0,0334 ^a	0,0432 ^a	0,0362 ^a	0,0413 ^{ab}	0,0417 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 9U2	0,0268 ^a	0,0237 ^a	0,0231 ^a	0,0270 ^a	0,0266 ^a	0,0246 ^a	0,0263 ^a	0,0314 ^a	0,0291 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 11U1	0,0312 ^a	0,0292 ^a	0,0287 ^a	0,0286 ^a	0,0298 ^a	0,0308 ^a	0,0303 ^a	0,0298 ^a	0,0307 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 13U2	0,0425 ^a	0,0408 ^a	0,0548 ^a	0,0380 ^a	0,0417 ^a	0,0449 ^a	0,0427 ^a	0,0478 ^{ab}	0,0484 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 14U	0,0319 ^a	0,0359 ^a	0,0322 ^a	0,0315 ^a	0,0452 ^a	0,0433 ^a	0,0369 ^a	0,0442 ^{ab}	0,0393 ^a

Valores com letras sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem ($p < 0,05$).

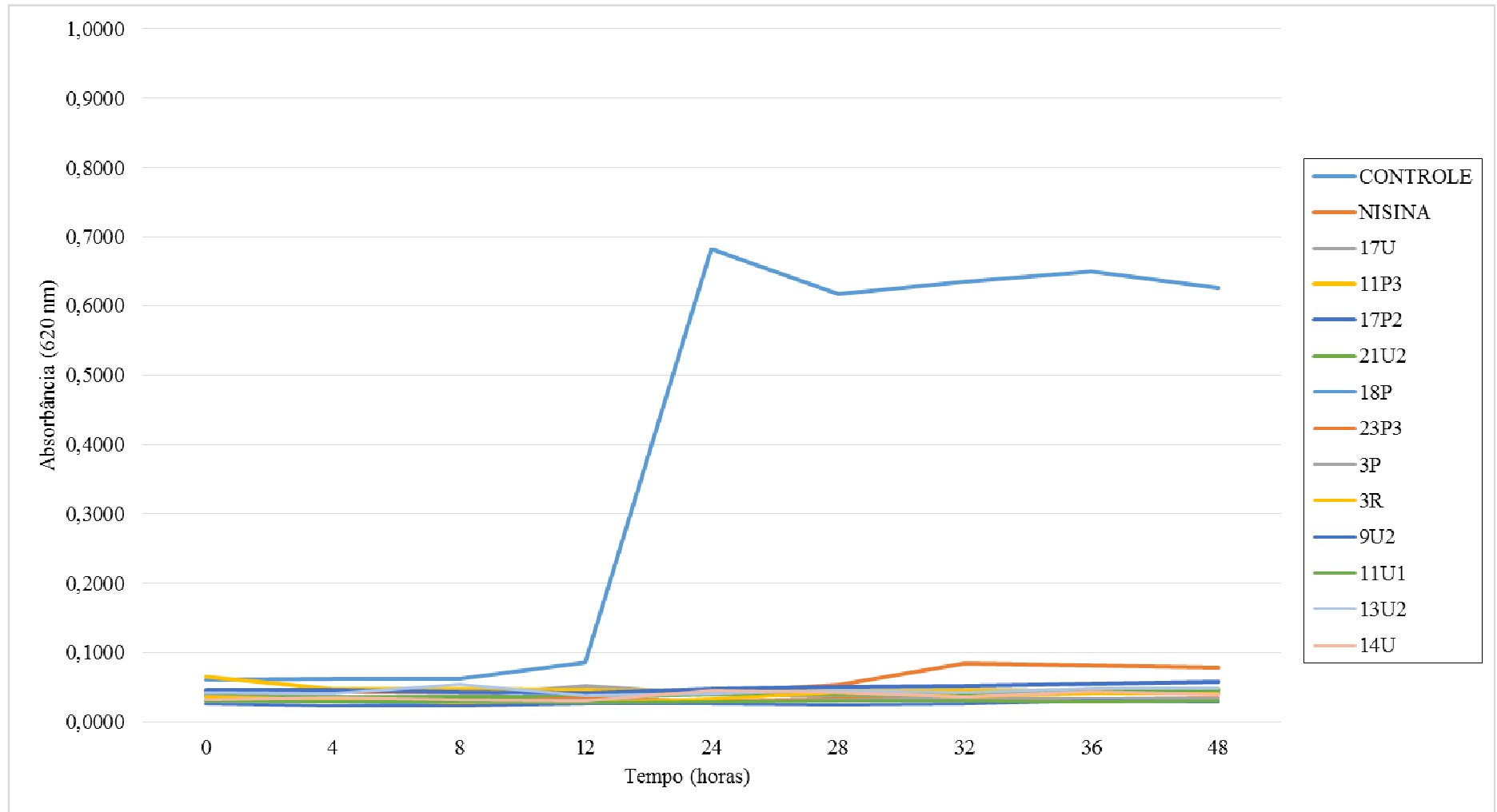


Figura 9: Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* isolada de salsicha e atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.

Tabela 11: Valores médios de absorvância para atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) por período de incubação contra cepa de *Listeria monocytogenes* 1/2a em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação

SF	TEMPO (h)								
	0	4	8	12	24	28	32	36	48
Controle	0,0616 ^a	0,0611 ^a	0,0611 ^a	0,0640 ^a	0,4772 ^b	0,5390 ^b	0,5327 ^b	0,4015 ^b	0,3527 ^b
Nisina	0,0712 ^a	0,0710 ^a	0,0722 ^a	0,0735 ^a	0,0762 ^a	0,0753 ^a	0,0794 ^a	0,0755 ^a	0,0797 ^a
<i>Lactobacillus casei</i> 17U	0,0465 ^a	0,0368 ^a	0,0362 ^a	0,0342 ^a	0,0362 ^a	0,0345 ^a	0,0351 ^a	0,0352 ^a	0,0373 ^a
<i>Lactobacillus perolens</i> 11P3	0,0445 ^a	0,0410 ^a	0,0402 ^a	0,0474 ^a	0,0505 ^a	0,0552 ^a	0,0528 ^a	0,0564 ^a	0,0484 ^a
<i>Lactobacillus perolens</i> 17P2	0,0421 ^a	0,0527 ^a	0,0389 ^a	0,0397 ^a	0,0385 ^a	0,0393 ^a	0,0397 ^a	0,0376 ^a	0,0384 ^a
<i>Lactobacillus mali</i> 21U2	0,0406 ^a	0,0366 ^a	0,0371 ^a	0,0368 ^a	0,0362 ^a	0,0363 ^a	0,0373 ^a	0,0357 ^a	0,0368 ^a
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P	0,0355 ^a	0,0265 ^a	0,0301 ^a	0,0220 ^a	0,0288 ^a	0,0247 ^a	0,0290 ^a	0,0285 ^a	0,0264 ^a
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 23P3	0,0346 ^a	0,0310 ^a	0,0296 ^a	0,0339 ^a	0,0308 ^a	0,0309 ^a	0,0316 ^a	0,0311 ^a	0,0330 ^a
<i>Lactococcus lactis</i> 3P	0,0398 ^a	0,0316 ^a	0,0312 ^a	0,0265 ^a	0,0263 ^a	0,0242 ^a	0,0264 ^a	0,0253 ^a	0,0265 ^a
<i>Lactococcus lactis</i> 3R	0,0299 ^a	0,0306 ^a	0,0310 ^a	0,0333 ^a	0,0269 ^a	0,0260 ^a	0,0281 ^a	0,0275 ^a	0,0296 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 9U2	0,0232 ^a	0,0238 ^a	0,0223 ^a	0,0226 ^a	0,0228 ^a	0,0231 ^a	0,0238 ^a	0,0228 ^a	0,0237 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 11U1	0,0306 ^a	0,0299 ^a	0,0286 ^a	0,0237 ^a	0,0303 ^a	0,0313 ^a	0,0304 ^a	0,0301 ^a	0,0310 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 13U2	0,0466 ^a	0,0423 ^a	0,0435 ^a	0,0389 ^a	0,0408 ^a	0,0488 ^a	0,0601 ^a	0,0408 ^a	0,0455 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 14U	0,0404 ^a	0,0278 ^a	0,0341 ^a	0,0384 ^a	0,0280 ^a	0,0300 ^a	0,0290 ^a	0,0268 ^a	0,0303 ^a

Valores com letras sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem ($p < 0,05$).

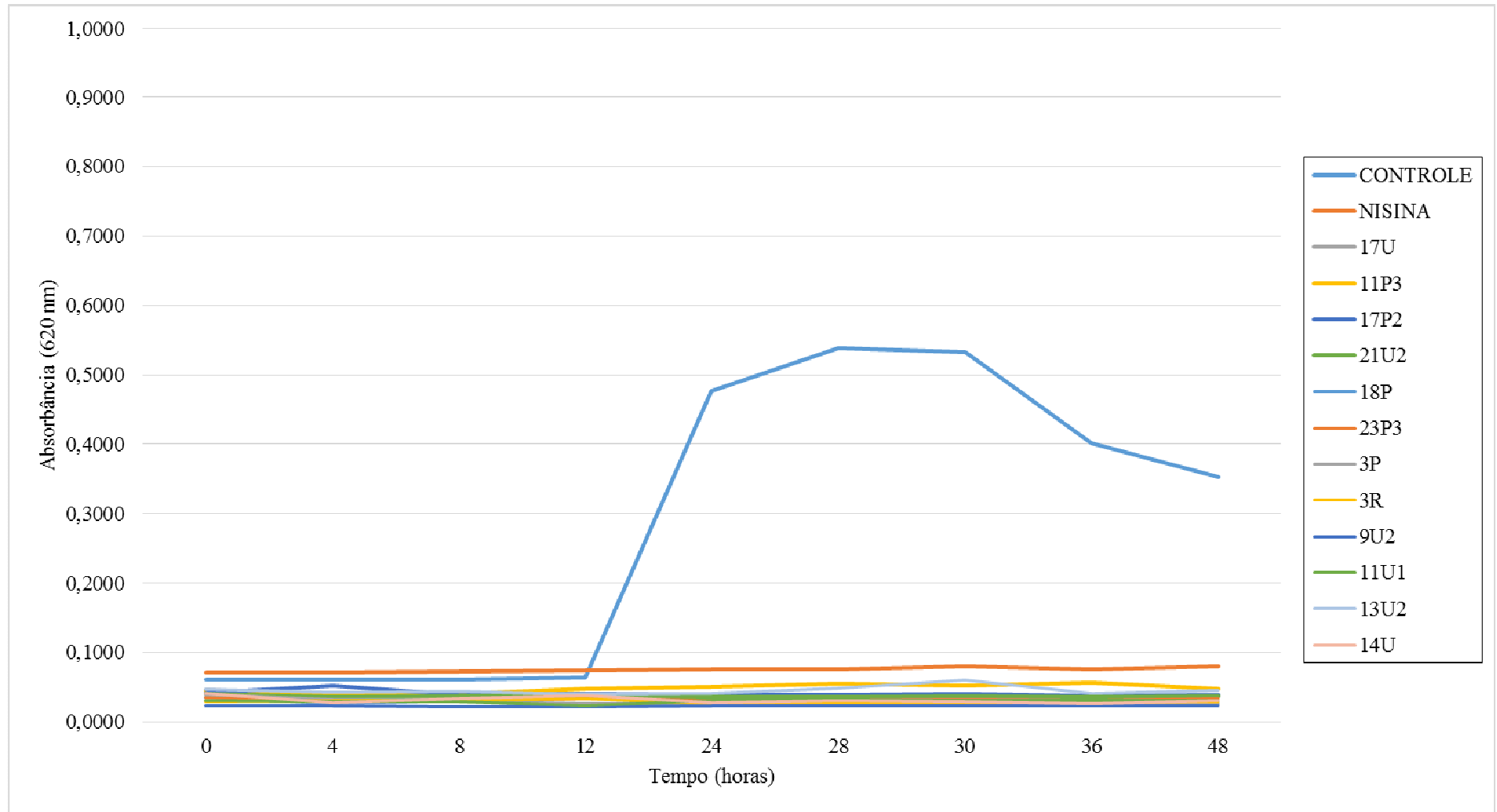


Figura 10: Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* 1/2a e atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.

Tabela 12: Valores médios de absorvância para atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) por período de incubação contra cepa de *Listeria monocytogenes* 4a em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação

SF	TEMPO (h)								
	0	4	8	12	24	28	32	36	48
Controle	0,0650 ^{abc}	0,0606 ^b	0,0619 ^b	0,0788 ^b	0,2548 ^c	0,2040 ^c	0,2960 ^c	0,3112 ^c	0,4185 ^c
Nisina	0,0958 ^c	0,1281 ^c	0,1215 ^c	0,1201 ^c	0,1284 ^b	0,1316 ^b	0,1372 ^b	0,1297 ^b	0,1497 ^b
<i>Lactobacillus casei</i> 17U	0,0370 ^{ab}	0,0317 ^{ab}	0,0290 ^{ab}	0,0330 ^a	0,0339 ^a	0,0343 ^a	0,0518 ^a	0,0356 ^a	0,0344 ^a
<i>Lactobacillus perolens</i> 11P3	0,0633 ^{ab}	0,0580 ^{ab}	0,0357 ^{ab}	0,0366 ^a	0,0388 ^a	0,0534 ^a	0,0427 ^a	0,0451 ^a	0,0409 ^a
<i>Lactobacillus perolens</i> 17P2	0,0373 ^{ab}	0,0415 ^{ab}	0,0329 ^{ab}	0,0384 ^a	0,0407 ^a	0,0376 ^a	0,0365 ^a	0,0377 ^a	0,0375 ^a
<i>Lactobacillus mali</i> 21U2	0,0376 ^{ab}	0,0344 ^{ab}	0,0292 ^{ab}	0,0305 ^a	0,0380 ^a	0,0365 ^a	0,0364 ^a	0,0368 ^a	0,0380 ^a
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P	0,0307 ^{ab}	0,0258 ^{ab}	0,0230 ^a	0,0541 ^{ab}	0,0249 ^a	0,0311 ^a	0,0271 ^a	0,0266 ^a	0,0283 ^a
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 23P3	0,0313 ^{ab}	0,0280 ^{ab}	0,0338 ^{ab}	0,0257 ^a	0,0317 ^a	0,0314 ^a	0,0322 ^a	0,0319 ^a	0,0337 ^a
<i>Lactococcus lactis</i> 3P	0,0355 ^{ab}	0,0293 ^{ab}	0,0257 ^a	0,0253 ^a	0,0250 ^a	0,0276 ^a	0,0248 ^a	0,0280 ^a	0,0283 ^a
<i>Lactococcus lactis</i> 3R	0,0324 ^{ab}	0,0275 ^{ab}	0,0236 ^a	0,0437 ^{ab}	0,0301 ^a	0,0270 ^a	0,0273 ^a	0,0279 ^a	0,0300 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 9U2	0,0276 ^a	0,0234 ^a	0,0207 ^a	0,0214 ^a	0,0308 ^a	0,0330 ^a	0,0458 ^a	0,0264 ^a	0,0278 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 11U1	0,0295 ^{ab}	0,0269 ^{ab}	0,0231 ^a	0,0243 ^a	0,0305 ^a	0,0301 ^a	0,0311 ^a	0,0304 ^a	0,0330 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 13U2	0,0430 ^{ab}	0,0376 ^{ab}	0,0433 ^{ab}	0,0400 ^a	0,0516 ^a	0,0361 ^a	0,0364 ^a	0,0428 ^a	0,0380 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 14U	0,0330 ^{ab}	0,0369 ^{ab}	0,0263 ^{ab}	0,0282 ^a	0,0274 ^a	0,0277 ^a	0,0300 ^a	0,0339 ^a	0,0303 ^a

Valores com letras sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem ($p < 0,05$).

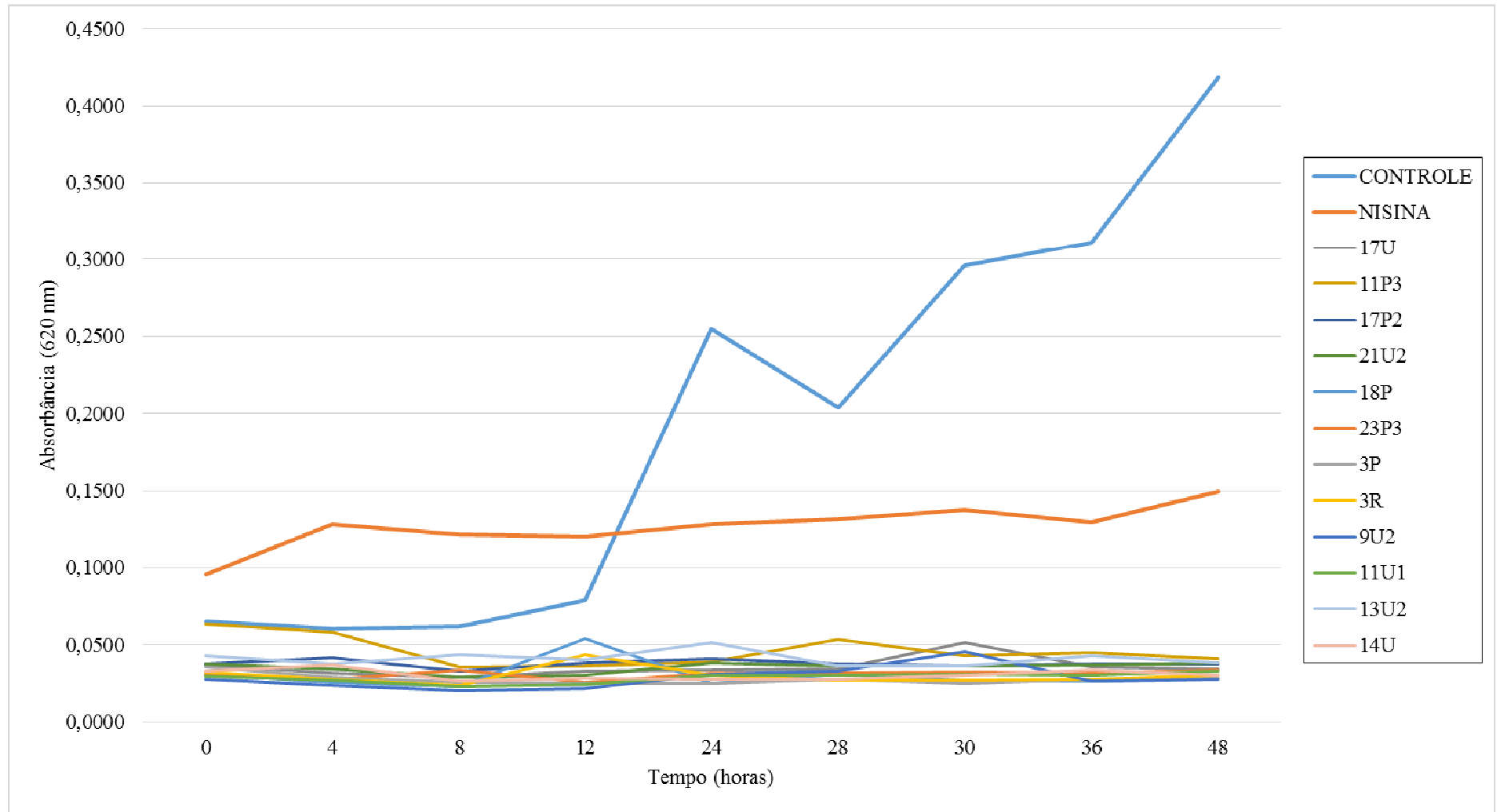


Figura 11: Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* 4a e atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.

Tabela 13: Valores médios de absorvância para atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) por período de incubação contra cepa de *Listeria monocytogenes* 4b em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação

SF	TEMPO (h)								
	0	4	8	12	24	28	32	36	48
Controle	0,0636 ^a	0,0644 ^a	0,0631 ^a	0,0777 ^a	0,9073 ^b	0,8892 ^b	0,6376 ^b	0,5890 ^b	0,4037 ^b
Nisina	0,0834 ^a	0,1068 ^a	0,1081 ^a	0,1149 ^a	0,1104 ^a	0,1235 ^a	0,1194 ^a	0,1273 ^a	0,1242 ^a
<i>Lactobacillus casei</i> 17U	0,0357 ^a	0,0270 ^a	0,0299 ^a	0,0313 ^a	0,0339 ^a	0,0367 ^a	0,0365 ^a	0,0381 ^a	0,0375 ^a
<i>Lactobacillus perolens</i> 11P3	0,0555 ^a	0,0375 ^a	0,0358 ^a	0,0380 ^a	0,0344 ^a	0,0388 ^a	0,0566 ^a	0,0356 ^a	0,0428 ^a
<i>Lactobacillus perolens</i> 17P2	0,0457 ^a	0,0326 ^a	0,0354 ^a	0,0412 ^a	0,0423 ^a	0,0377 ^a	0,0614 ^a	0,0395 ^a	0,0384 ^a
<i>Lactobacillus mali</i> 21U2	0,0480 ^a	0,0344 ^a	0,0355 ^a	0,0405 ^a	0,0644 ^a	0,0384 ^a	0,0440 ^a	0,0372 ^a	0,0390 ^a
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P	0,0374 ^a	0,0237 ^a	0,0229 ^a	0,0280 ^a	0,0265 ^a	0,0257 ^a	0,0253 ^a	0,0255 ^a	0,0242 ^a
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 23P3	0,0353 ^a	0,0313 ^a	0,0322 ^a	0,0337 ^a	0,0364 ^a	0,0387 ^a	0,0354 ^a	0,0363 ^a	0,0364 ^a
<i>Lactococcus lactis</i> 3P	0,0277 ^a	0,0273 ^a	0,0314 ^a	0,0297 ^a	0,0250 ^a	0,0238 ^a	0,0212 ^a	0,0246 ^a	0,0247 ^a
<i>Lactococcus lactis</i> 3R	0,0308 ^a	0,0254 ^a	0,0264 ^a	0,0322 ^a	0,0417 ^a	0,0387 ^a	0,0361 ^a	0,0404 ^a	0,0324 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 9U2	0,0267 ^a	0,0275 ^a	0,0269 ^a	0,0229 ^a	0,0275 ^a	0,0296 ^a	0,0277 ^a	0,0308 ^a	0,0424 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 11U1	0,0284 ^a	0,0281 ^a	0,0286 ^a	0,0310 ^a	0,0292 ^a	0,0296 ^a	0,0301 ^a	0,0319 ^a	0,0310 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 13U2	0,0373 ^a	0,0317 ^a	0,0360 ^a	0,0449 ^a	0,0381 ^a	0,0350 ^a	0,0417 ^a	0,0358 ^a	0,0415 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 14U	0,0388 ^a	0,0272 ^a	0,0301 ^a	0,0341 ^a	0,0563 ^a	0,0282 ^a	0,0385 ^a	0,0291 ^a	0,0261 ^a

Valores com letras sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem ($p < 0,05$).

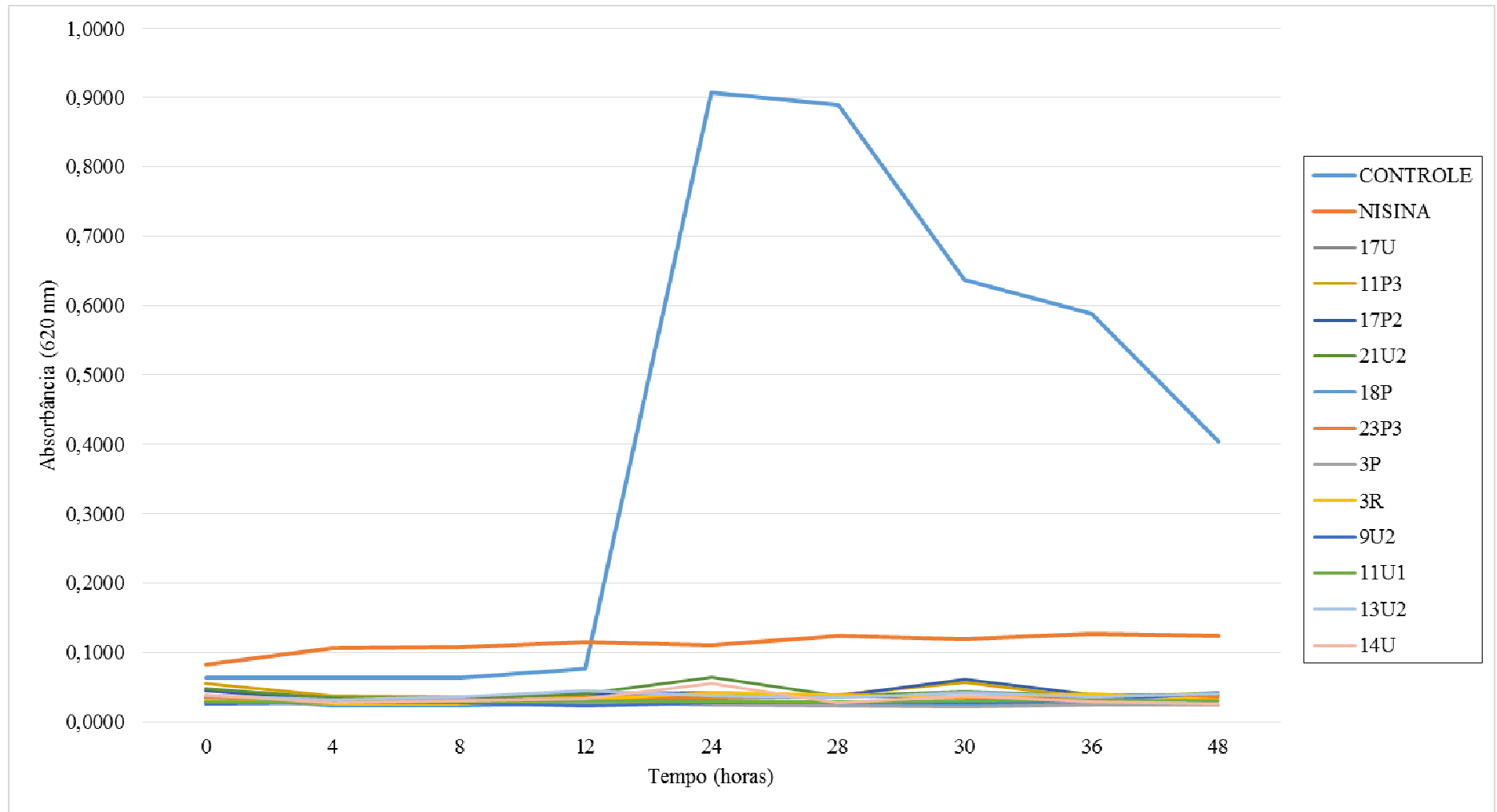


Figura 12: Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* 4b e atividade inibitória de sobrenadantes filtrados (SF) em teste de atividade inibitória indireta em placas de microtitulação.

O ensaio por microtitulação em placas foi conduzido para avaliação de atividade antimicrobiana após a realização dos ensaios de inibição direta e indireta, respectivamente. Os resultados apresentados por esses três métodos podem ser comparados, de modo a estabelecer correlação entre os mesmos. Conforme mencionado no subitem 5.1, a cepa de BAL que exibiu melhor desempenho no teste de atividade inibitória direta por método *spot-on-lawn*, avaliado pelo maior diâmetro de halo, corresponde a *Lactobacillus perolens* 17P2. Por outro lado, os SNF e SF da respectiva cepa não demonstraram resultados relevantes no ensaio de microtitulação em placas. Nesse último, os sobrenadantes que exibiram melhor desempenho correspondem aos de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 que, por sua vez, não demonstrou resultado expressivo no teste direto. A partir dessas informações, pode-se inferir que a ação inibitória exibida por 17P2 é exercida, majoritariamente, por ácidos ou peróxido de hidrogênio, enquanto o efeito de SNF 9U2 pode ser resultado de bacteriocinas ou substâncias semelhantes à bacteriocinas. Portanto, para o presente trabalho, pode-se observar que o teste direto não apresenta boa correlação com o de microtitulação em placas aplicado para avaliação de SNF.

Resultados similares foram descritos em estudo de Rozoy *et al.* (2013), em que testes de inibição direta por *spot-on-lawn* e indireta por difusão em ágar, além de microtitulação em placas, foram conduzidos para avaliação de atividade antimicrobiana de extratos de chá verde contra bactérias patogênicas. Segundo os autores, os resultados obtidos por teste em microplacas apresentaram-se contrários àqueles exibidos pelos dois primeiros ensaios, devido ao fato de os microrganismos alvo estarem em contato direto com as substâncias ativas durante o teste de microtitulação, sem precisarem ser conduzidas por difusão em meio sólido (neste caso, ágar), esse método é considerado o mais confiável, apesar de mais fastidioso.

Ainda, conforme mencionado no subitem 5.3, o teste de inibição por microtitulação em placas foi conduzido com os mesmos SF e SNF utilizados no teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em ágar contra quatro cepas de *Listeria monocytogenes*. Nesse último, uma grande parcela de sobrenadantes exibiu atividade contra o patógeno, o que vai de encontro com os resultados negativos apresentados pelo primeiro. Os valores de absorvância da 24^a hora obtidos pelo teste de microtitulação em placas podem ser comparados com o resultado de inibição, nesse mesmo tempo, apresentado pelo ensaio de difusão em poços. Essa equiparação permite inferir que a avaliação de atividade antimicrobiana por ensaios de difusão em ágar é influenciada pelo tipo de ágar, concentração de sal, temperatura de incubação e tamanho molecular dos componentes antimicrobianos (OLIVEIRA *et al.*, 2007), além de outros interferentes. Os fatores pontuados, além dos citados no subitem 4.3, podem,

portanto, contribuir para elucidar a aparente contradição entre os resultados desfavoráveis obtidos pelo método de difusão em ágar e os promissores exibidos pelo método de microtitulação em placas deste trabalho.

O ensaio de microtitulação em placas apresenta vantagens em relação ao método de difusão em ágar por minimizar grande parte dos fatores responsáveis por interferirem no processo de difusão, o que se confirma neste estudo. Segundo Langfield *et al.* (2004), a microtitulação em placas provou ser um método rápido, de fácil utilização, além de uma ferramenta efetiva para identificação de quantitativa de bioatividade por apresentar elevada sensibilidade para quantidades mínimas de extrato utilizadas, habilidade em distinguir entre efeito bactericida e bacteriostático, bem como evitar a ambiguidade associada à comparação visual e/ou mensuração de zonas de inibição em placas com ágar. Para McBride *et al.* (2005), o uso deste ensaio é extremamente vantajoso, já que é rápido, permite a leitura de resultados de forma não subjetiva, requer pequenas quantidades de materiais para ser executado, pode ser facilmente automatizado e, por fim, é passível de escalonamento para produção em larga escala.

Comumente utilizada na área de plantas medicinais para demonstração de atividade antimicrobiana de extratos, constatou-se, na literatura, até o presente momento, poucos relatos em que a técnica de microtitulação em placas é utilizada para demonstração de atividade antimicrobiana de SF e SNF de BAL contra microrganismos patogênicos (MILLETTE *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2012; LAU E LIONG, 2014; HOR E LIONG, 2014). Nesses estudos, tanto SF quanto SNF obtidos de BAL demonstraram eficiência em inibir o crescimento dos respectivos microrganismos indicadores, assim como neste trabalho. No entanto, apesar da escassez de relatos envolvendo técnicas de microtitulação para determinação de atividade inibitória de metabólitos de BAL contra microrganismos, há número considerável de trabalhos relatando a capacidade de SF e SNF de BAL em controlar o crescimento de patógenos, como *Listeria monocytogenes*, por diferentes métodos.

Em estudo de Benkerroum *et al.* (2007), demonstrou-se atividade inibitória de BAL bacteriocinogênicas dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* isoladas de diferentes produtos marroquinos, ao testar seus respectivos SNF contra *Listeria monocytogenes* pelo método de difusão em ágar.

De modo semelhante, outros autores demonstraram atividade contra *Listeria monocytogenes* de grãos ou por BAL e/ou seus metabólitos isolados de kefir. Em estudo de Gulmez e Guven (2003), a partir de técnica de *spread plate*, observou-se que, além de

microrganismos patogênicos como *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica*, amostras de leite fermentadas com kefir apresentaram capacidade inibitória contra *Listeria monocytogenes*.

Em trabalho conduzido por Santos *et al.* (2003), demonstrou-se que cepas de BAL do gênero *Lactobacillus*, isoladas de grãos de kefir, apresentaram atividade antimicrobiana contra os enteropatógenos *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*.

Similarmente, Ulusoy *et al.* (2007) também observaram efeito inibitório de kefir contra patógenos de importância alimentar, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*.

A aplicação de BAL e de bacteriocinas para inibição de microrganismos patogênicos, em especial *Listeria monocytogenes*, também é relatada durante o processamento de alimentos, garantindo segurança e estabilidade ao produto.

Em estudo conduzido por teste *in situ* em molho de carne, Alves *et al.* (2003) demonstraram a capacidade de inibição de cepa bacteriocinogênica de *Lactobacillus sakei* contra cepas de *Listeria monocytogenes* sorotipos 1/2a e 4b.

De modo similar, Liserre *et al.* (2002) obteve sucesso em inibir *Listeria monocytogenes* em linguiça frescal, por meio da atividade sinérgica entre uma cepa bacteriocinogênica de *Lactobacillus sakei*, isolada do mesmo alimento, e a aplicação de embalagem com atmosfera modificada.

Utilizando duas cepas bacteriocinogênicas de *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus faecium* isoladas de queijo amarelo, Pingitore *et al.* (2012) tiveram como objetivo avaliar a efetividade dessas cepas em controlar o crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas frescal experimentalmente contaminado e compará-las com queijos elaborados com cepa não bacteriocinogênica de *Enterococcus faecalis* e nisina. Os autores observaram que o efeito bacteriostático das cepas de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus mundtii* possibilitou inibição de crescimento do patógeno por até 6 e 12 dias, respectivamente, enquanto que em queijos contendo nisina uma redução menor que de um log na população de *Listeria monocytogenes* foi observada.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados deste estudo, é possível concluir que:

- As cepas de BAL isoladas de kefir apresentaram atividade antagonista contra outras cepas de BAL, conforme demonstrado pelos testes de atividade inibitória direta por método *spot-on-lawn* e atividade inibitória indireta por método de difusão em poços.
- O teste de atividade inibitória indireta conduzido em placas de microtitulação demonstrou ser adequado para avaliação de atividade antimicrobiana, além de oferecer diversas vantagens em relação ao teste de atividade inibitória indireta por método de difusão em poços.
- Os SNF e SF obtidos de cepas de BAL pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, isoladas de grãos de kefir, apresentaram efeito inibitório significativo contra cepas de *Listeria monocytogenes* em função do tempo considerado e, em alguns casos, ação similar à da nisina.
- Os SNF das cepas de BAL de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 e *Lactococcus lactis* 3R foram os que apresentaram melhores resultados quanto à inibição de quatro cepas de *Listeria monocytogenes*.
- O SF da cepa de BAL de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 foi o que apresentou os melhores resultados numéricos quanto à inibição de três cepas de *Listeria monocytogenes*.
- As cepas de BAL isoladas de grãos de kefir estudadas possuem capacidade de produção de substâncias com atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* e, portanto, são dotadas de qualidade probiótica a serem consideradas, futuramente, como agentes antimicrobianos em tecnologia de alimentos para biopreservação.

7. REFERÊNCIAS

- ABRAM, M.; SCHLÜTER, D.; VUCKOVIC, D.; WRABER, B.; DORIC, M.; DECKERT, M. Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. **FEMS Immunology e Medical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 177-182, 2003.
- AGRAWAL, R.; DHARMESH, S. An anti-*Shigella dysenteriae* bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* MTCC 5151 cheese isolate. **Turkish Journal of Biology**, v. 36, n. 2, p. 177-185, 2012.
- ALI, A.A. Beneficial role of lactic acid bacteria in food preservation and human health: A review. **Research Journal of Microbiology**, v.5, p.1213-122, 2010.
- ALLERBERGER, F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunology e Medical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 183-189, 2003.
- ALVES, V.F.; SICCHIROLI LAVRADOR, M.A.; PEREIRA DE MARTINIS, E.C. Bacteriocin exposure and food ingredients influence on growth and virulence of *Listeria monocytogenes* in a model meat gravy system. **Journal of Food Safety**, v. 23, n. 3, p. 201-217, 2003.
- AMMOR, M.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. **Meat Science**, v.76, n.1, p.138-146, 2007.
- AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1 - Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control**, v. 17, n. 6, p. 454-461, 2006.
- ANSELMO, R.J.; VIORA, S.S.; OJEDA, P.A.; LAUSADA, L.I. Efecto antagónico del kefir sobre endosporas y células vegetativas de *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*. **Información Tecnológica**, v. 21, n. 4, p. 131-138, 2010.
- ASADUZZAMAN, S.M.; AL-MAHIN, A.; BASHAR, T.; NOOR, R. Lantibiotics: A Candidate for Future Generation of Antibiotics. **Stamford Journal of Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2011.
- ASAHINA, T.; HARA, K.; ARAKAWA, K.; NAKANO, H.; MIYAMOTO, T. Production of bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides* 406 isolated from Mongolian fermented mare's milk, airag. **Animal Science Journal**, v.83, n.10, p.704-711, 2012.
- ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. **International Food Research Journal**, v.18, n.3, p.837-853, 2011.
- AWAISHEH, S. S. Incidence and contamination level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in ready-to-eat meat products in Jordan. **Journal of Food Protection®**, v. 73, n. 3, p. 535-540, 2010.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3rd ed. New York, NY: Maercel Decker, 2004, p.1-66.
- BACK, W.; BOHAK, I.; EHRMANN, M.; LUDWIG, W.; POT, B.; KERSTERS, K.; SCHLEIFER, K. H. *Lactobacillus perolens* sp. nov., a soft drink spoilage bacterium. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, p. 354-359, 1999.
- BARANCELLI, G.V.; SILVA-CRUZ, J.V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C.A.F. *Listeria monocytogenes*: occurrence in dairy products and its implications in public health. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 155-168, 2011.
- BENKERROUM, N.; GHOUATI, Y.; GHALFI, H. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from various Moroccan food products and partial characterization of putative bacteriocins. **Biotechnology**, v. 6, n. 4, 2007.

BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L.; COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v.11, p.259-274, 2001.

BEZERRA, A.B.; BOARI, C.D.; OLIVEIRA, M.N.; ZANCANARO JR, O.D. Kefir x iogurte: uma comparação sensorial. **Indústria de Laticínios**, v. 1/2, n. 19, p. 64-66, 1999.

BILLE, J. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. **Foodborne Listeriosis**, p. 71-74, 1990.

BILLE, J.; BLANC, D.S; SCHMID, H.; BOUBAKER, K.; BAUMGARTNER, A.; SIEGRIST, H.H.; TRITTEN, M.L.; LIENHARD, R.; BERNER, D.; ANDERAU, R.; TREBOUX, M.; DUCOMMUN, J.M.; MALINVERNI, R.; GENNÉ, D.; ERARD, P.H.; WAESPI, U. Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005. **Eurosurveillance**, v. 11, n. 6, p. 91-93, 2006.

BORDIGNON JUNIOR, S.E.; GATTI, D.J.; GELINSKI, J.M.L.N. Antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from artisan italian salami. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.13, p.18-22, 2010.

BOUTTEFROY, A.; LINDER, M.; MILLIÈRE, J.B. Predictive models of the combined effects of curvaticin 13, NaCl and pH on the behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 6, p. 919-929, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada. **RDC nº. 02, de 07 de janeiro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionas e ou de Saúde. Diário Oficial da União, 09 jan. 2002. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bdac5c80474597399f7ddf3fbc4c6735/rdc_02.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 11/06/2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 46, de 23 de Outubro de 2007**. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial, Brasília, 24 Outubro 2007, seção 1, p. 5. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/INSTRU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%BA-46-DE-23-DE-OUTUBRO-DE-2007.pdf>>. Acesso em 11/06/2014.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 09, de 8 de abril de 2009**. Institui os procedimentos de controle de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Programa_de_Listeria%281%29.pdf>. Acesso em 11/06/2014.

BRILLET, A.; PILET, M.F.; PREVOST, H.; BOUTTEFROY, A.; LEROI, F. Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 5, p. 1029-1037, 2004.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R.R.; CINTRA, H.C. Characterisation of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 and the effect of this compound on *Listeria monocytogenes* in beef. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 135-144, 2006.

BUDZIŃSKA, K.; WRÓŃSKI, G.; SZEJNIAK, B. Survival time of bacteria *Listeria monocytogenes* in water environment and sewage. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 21, n. 1, p. 31-37, 2012.

BÜLA, C.J.; BILLE, J.; GLAUSER, M.P. An epidemic of food-borne listeriosis in western Switzerland: description of 57 cases involving adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 66-72, 1995.

BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.57, n.4, p.373-380, 2007.

ÇADIRCI, B.H.; CITAK, S. A comparison of two methods used for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 237-241, 2005.

- CARASI, P.; DÍAZ, M.; RACEDO, S.M.; DE ANTONI, G.; URDACI, M.C.; SERRADELL, M.D.L.A. Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefiri*. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-7, 2014.
- CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v.28, p.281–370, 2002.
- CARR, J.G.; DAVIES, A. Homofermentative *Lactobacilli* of cider including *Lactobacillus mali* nov. spec. **Journal of Applied Bacteriology**, v.33, n.4, p.768-774, 1970.
- CASALTA, E.; MONTEL, M. C. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 271–273, 2008.
- CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 3, p. 82-100, 2003.
- CHOI, H.J.; CHEIGH, C.I.; KIM, S.B.; PYUN, Y.R. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.4, p.563-571, 2000.
- CINTAS, L.M. **Caracterización bioquímica y genética parcial de la pediocina L50, una nueva bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* L50 aislado de embutidos crudos curados**. 1995. Tese (Doutorado em Microbiologia e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, 1995.
- CINTAS, L.M.; CASAUS, M.P.; HERRANZ, C.; NES, I.F.; HERNÁNDEZ, P.E. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 4, p. 281-305, 2001.
- CLAESSON, M.J.; VAN SINDEREN, D.; O'TOOLE, P.W. *Lactobacillus* phylogenomics-towards a reclassification of the genus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p.2945–2954, 2008.
- CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.
- COSENTINO, S.; FADDA, M.E.; DEPLANO, M.; MELIS, R.; POMATA, R.; PISANO, M.B. Antilisterial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.
- COTTER, P.D.; ROSS, R.P.; HILL, C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 95-105, 2013.
- DAL BELLO, B.; COCOLIN, L.; ZEPPA, G.; FIELD, D.; COTTER, P.D.; HILL, C. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1, p. 58-65, 2012.
- DALLA SANTA, O.R. **Avaliação da qualidade de salames artesanais e seleção de culturas “starter” para a produção de salame tipo italiano**. 133p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- DARSANAKI, R.K.; ROKHI, M.L.; ALIABADI, M.A.; ISSAZADEH, K. Antimicrobial activities of *Lactobacillus* strains isolated from fresh vegetables. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 11, n. 9, p. 1216-1219, 2012.
- DAWSON, S.J.; EVANS, M.R.W.; WILLBY, D.; BARDWELL, J.; CHAMBERLAIN, N.; LEWIS, D.A. *Listeria* outbreak associated with sandwich consumption from a hospital retail shop, United Kingdom. **Eurosurveillance**, v. 11, n. 6, p. 89-91, 2006.
- DE CARVALHO, T.; DE PAULA, R.A.; MANTOVANI, H.C.; DE MORAES, C.A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. **Food Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 213-219, 2006.

DE MARTINIS, E.C.P.; PÚBLIO, M.R.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 32-37, 2001.

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.2/3, p.191-208, 2002.

DE MARTINIS, E.C.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados a vácuo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.2, p.195-199, 2003.

DE VUYST, L.; CALLEWAERT, R.; CRABBÉ, K. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. **Microbiology**, v. 142, n. 4, p. 817-827, 1996.

DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 194-199, 2007.

DELLAGLIO, F.; FELIS, G.E. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. In TANNOCK, G.W. **Probiotics and prebiotics: scientific aspects**. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2005, p. 25-49.

DELVIS-BROUGHTON, J. Nisin as a food preservative. **Food Australia**, v. 57, n. 12, p. 525-532, 2005.

DIAS, P.A. **Atividade antimicrobiana de microrganismos presentes em grãos de kefir**. 2011. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

DICKS, L.M.T.; BOTES, M. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. **Beneficial Microbes**, v. 1, n. 1, p. 11-29, 2010.

DIEP, D.B.; NES, I.F. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. **Current Drug Targets**, v. 3, n. 2, p. 107-122, 2002.

DOBSON, A.; COTTER, P.D.; ROSS, R.P.; HILL, C. Bacteriocin production: a probiotic trait? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 1-6, 2012.

DONNELLY, C.W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition Reviews**, v. 59, n. 6, p. 183-194, 2001.

EIJSINK, V.G.; AXELSSON, L.; DIEP, D.B.; HÅVARSTEIN, L.S.; HOLO, H.; NES, I.F. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1-4, p. 639-654, 2002.

ENDO, A.; OKADA, S. *Lactobacillus satsumensis* sp. nov., isolated from mashes of shochu, a traditional Japanese distilled spirit made from fermented rice and other starchy materials. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.83-85, 2005.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus *Lactobacillus* (2014). Disponível em <<http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html>>. Acesso em 21/01/2014^a.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus *Lactococcus* (2014). Disponível em <<http://www.bacterio.cict.fr/l/lactococcus.html>>. Acesso em 21/01/2014^b.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus *Leuconostoc* (2014). Disponível em <<http://www.bacterio.net/leuconostoc.html>>. Acesso em 24/01/2014^c.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus *Listeria* (2014). Disponível em <<http://www.bacterio.net/listeria.html>>. Acesso em 21/02/2014^d.

FAI, A.E.C.; FIGUEIREDO, E.A.T.; VERDIN, S.E.F.; PINHEIRO, N.M.S.; BRAGA, A.R.C.; STAMFORD, T.L.M. *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.16, n.2, p. 657-662, 2011.

FAO. **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: 15/01/2014.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Codex Standard for Fermented Milks #243**. 2003. Disponível em <<http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/>>. Acesso em 18/04/2014.

FAO. 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**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf>. Acesso em 24/04/2014.

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

FARNWORTH, E.R. Kefir - a complex probiotic. **Food Science and Technology Bulletin**, v. 2, p. 1-17, 2005.

FEFER, J.J.; RATZAN, K.R.; SHARP, S.E.; SAIZ, E. *Lactococcus garvieae* endocarditis: report of a case and review of the literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.32, n.2, p.127-130, 1998.

FELIS, G.E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.8, p.44-61, 2007.

FELIS, G.E.; DELLAGLIO, F.; MIZZI, L.; TORRIANI, S. Comparative sequence analysis of a recA gene fragment brings new evidence for a gange in the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n.6, p.2113-2117, 2001.

FENLON, D.R.; WILSON, J.; DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. **Journal of Applied Microbiology**, v. 81, n. 6, p. 641-650, 1996.

FERREIRA, V.; WIEDMANN, M.; TEIXEIRA, P.; STASIEWICZ, M.J. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 1, p. 150-170, 2014.

FERRONATTO, A.I. **Contaminação de carcaças e ambiente por *Listeria* sp. em diferentes etapas do abate de suínos**. 2010. 64p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas de Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.

FLEMING, D.W.; COCHI, S.L.; MACDONALD, K.L.; BRONDUM, J.; HAYES, P.S.; PLIKAYTIS, B.D.; HOLMES, M.B.; AUDURIER, A.; BROOME, C.V.; REINGOLD, A.L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 7, p. 404-407, 1985.

FOOD SAFETY BRAZIL. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos**, 2013. Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.com/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-2013/>>. Acesso em: 15/07/2014.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 424p.

FOX, E.; O'MAHONY, T.; CLANCY, M.; DEMPSEY, R.; O'BRIEN, M.; JORDAN, K. *Listeria monocytogenes* in the Irish dairy farm environment. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 7, p. 1450-1456, 2009.

FOX, E.M.; LEONARD, N.; JORDAN, K. Molecular diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from Irish dairy farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 5, p. 635-641, 2011.

FROLA, I.D.; PELLEGRINO, M.S.; ESPECHE, M.C.; GIRAUDO, J.A.; NADER-MACIAS, M.E.; BOGNI, C.I. Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows' udders. **Journal of Dairy Research**, v.79, n.1, p.84-92, 2012.

FRYE, D. M.; ZWEIG, R.; STURGEON, J.; TORMEY, M.; LECAVALIER, M.; LEE, I.; LAWANI, L.; MASCOLA, L. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 943-949, 2002.

FUJISAWA, T.; ADACHL, I. S.; TOBA, T.; ARIHARA, K.; MITSUOKA, T. *Lactobacillus kefiranofaciens* sp. nov. isolated from kefir grains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, n.1, p.12-14, 1988.

FURTADO, D.N. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo fresco de leite de cabra**. 2010. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1, p. 51-70, 2007.

GARCÍA, P.; RODRÍGUEZ, L.; RODRÍGUEZ, A.; MARTÍNEZ, B. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. **Trends in Food Science e Technology**, v. 21, n. 8, p. 373-382, 2010.

GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 639-652, 2001.

GEORGE, C.P.; ARUN, B.; DARRELL, O.B. *Listeria monocytogenes*. In: FRATAMICO, P.M.; BHUNIA, A.K.; SMITH, J.L. **Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology**. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2005, p. 295-325.

GERMANO, M.I.S.; GERMANO, P.M.L. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela, 629p. parte 12, p.217-227, 2001.

GHALFI, H.; ALLAOUI, A.; DESTAIN, J.; BENKERROUM, N.; THONART, P. Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4°C storage. **Journal of Food Protection®**, v. 69, n. 5, p. 1066-1071, 2006.

GHANBARI, M.; REZAEI, M.; SOLTANI, M.; SHAH-HOSSEINI, G. Production of bacteriocin by a novel *Bacillus* sp. strain RF 140, an intestinal bacterium of Caspian Frisian Roach (*Rutilus frisii kutum*). **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 10, n. 3, p. 267-272, 2009.

GHANBARI, M.; JAMI, M.; DOMIG, K.J.; KNEIFEL, W. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria—a review. **Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 315-324, 2013.

GONG, H.S.; MENG, X.C.; WANG, H. Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China. **Food Control**, v. 21, n. 1, p. 89-96, 2010.

GOULET, V.; JACQUET, C.; VAILLANT, V.; REBIERE, I.; MOURET, E.; LORENTE, C.; MAILLOT, E.; STAINER, F.; ROCOURT, J. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. **The Lancet**, v. 345, n. 8964, p. 1581-1582, 1995.

GUDMUNDSDOTTIR, S.; GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; LAUZON, H.L.; EINARSSON, H.; KRISTINSSON, K.G.; KRISTJANSSON, M. Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**. v. 101, n. 1, p.41-51, 2005.

- GULMEZ, M.; GUVEN, A. Survival of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in different yogurt and kefir combinations as prefermentation contaminant. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 631-636, 2003.
- HAIKHXANI, R.; BEYATLI, Y.; BELMA ASLIM, B. Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v.60, p.105-108, 2007.
- HALAMI, P.M.; CHANDRASHEKAR, A.; NAND, K. *Lactobacillus farciminis* MD, a newer strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 197-202, 2000.
- HAMMES, W.P.; VOGEL, R.F. The genus *Lactobacillus*. In WOOD, B.J.B; HOLZAPFEL, W.H. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**, Vol. 2. Glasgow, UK: Blackie Academic e Professional, 1995, p.19-54.
- HAMON, M.; BIERNE, H.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 423-434, 2006.
- HAN, E.J.; LEE, N.K.; CHOI, S.Y.; PAIK, H.D. Bacteriocin KC24 produced by *Lactococcus lactis* KC24 from kimchi and its antilisterial effect in UHT milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 101-104, 2013.
- HELLAL, A.; AMROUCHE, L.; FERHAT, Z.; LARABA, F. Characterization of bacteriocin from *Lactococcus* isolated from traditional Algerian dairy products. **Annals of Microbiology**, v.62, n.1, p.177-185, 2012.
- HEMA, S.N.; SHANTHYA, R.; SARANYA, S. Antagonistic effects of Lactobacilli on gram-negative bacteria. **Journal of Advanced Laboratory Research on Biology**, v.2, n.2, p. 87-89, 2011.
- HEMME, D.; FOUCAUD-SCHEUNMANN, C.D. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. A review. **International Dairy Journal**, v.14, p.467-494, 2004.
- HEO, J.C.; LEE, S.H. Isolation and molecular taxonomy of two predominant types of microflora in kefir. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.52, p.375-379, 2006.
- HERRANZ, C.; CHEN, Y.; CHUNG, H.J.; CINTAS, L.M.; HERNANDEZ, P.E.; MONTVILLE, T.J.; CHIKINDAS, M.L. Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1689-1692, 2001.
- HIRAKAWA, T.F.; COSTA, F.A.A.; VILELA, M.C.; RIGON, M.; ABENSUR, H.; ARAÚJO, M.R.E. *Lactococcus garvieae* endocarditis: first case report in Latin America. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.97, n.5, p.108-110, 2011.
- HO, J.L.; SHANDS, K.N.; FRIEDLAND, G.; ECKIND, P.; FRASER, D. W. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. **Archives of Internal Medicine**, v. 146, n. 3, p. 520-524, 1986.
- HOFER, C.B.; MELLES, C.E.A.; HOFER, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 6, p.375-377, 1999.
- HOFER, E.; DOS REIS, C.M.F. Espécies e sorovares de *Listeria* isolados de animais doentes e portadores no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 79-83, 2005.
- HOFER, E.; NASCIMENTO, R.S.; OLIVEIRA, M.A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p. 173-177, 1998.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, vol.73, n.2, p.365S-373S, 2001.
- HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, v.35, p.109-116, 2002.

HOR, Y.Y.; LIONG, M.T. Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*. **Dermatologica Sinica**, p. 1-7, 2014.

HORI, T.; KIYOSHIMA, J.; SHIDA, K.; YASUI, H. Augmentation of cellular immunity and reduction of influenza virus titer in aged mice fed *Lactobacillus casei* strain Shirota. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, n.1, p.105-108, 2002.

HSIEH, H.H.; WANG, S.Y.; CHEN, T.L.; HUANG, Y.L.; CHEN, M.J. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, n.1, p.73-81, 2012.

HUGHES, C.; GILLESPIE, I.A.; O'BRIEN, S.J. Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Food Control**, v.18, n.7, p.766-772, 2007.

HUNT, K.; DRUMMOND, N.; MURPHY, M.; BUTLER, F.; BUCKLEY, J.; JORDAN, K.A. case of bovine raw milk contamination with *Listeria monocytogenes*. **Irish Veterinary Journal**, v. 65, n. 1, p. 13, 2012.

HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; D'HAENE, K.; VANKERCKHOVEN, V.; GOOSSENS, H.; SWINGS, J. Accuracy of the species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. **Research in Microbiology**, v.157, p.803-810, 2006.

ICHIRO SAKATE, R.; ARAGON, L.C.; RAGHIANTE, F.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M; DESTRO, M.T. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. **ALAN**, v. 53, n. 2, p. 184-187, 2003.

ILSI. Research Foundation/Risk Science Institute, Expert Panel on *Listeria monocytogenes* in Foods. Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis - a risk-based approach. **Journal of Food Protection®**, v. 68, n. 9, p. 1932-1994, 2005.

IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBANEZ, F.C. Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, v. 90, p. 613-620, 2005.

ISMAIEL, A.A.; GHALY, M.F.; EL-NAGGAR, A.K. Milk kefir: ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. **Current Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1602-1609, 2011.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Practice e Research Clinical Gastroenterology**, London, v.18, n.2, p.299-313, 2004.

IVANEK, R.; GRÖHN, Y.T.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. **Foodborne Pathogens e Disease**, v. 3, n. 4, p. 319-336, 2006.

IVORY, K.; CHAMBERS, S.J.; PIN, C.; PRIETO, E.; ARQUÉS, J.L.; NICOLETTI, C. Oral delivery of *Lactobacillus casei* Shirota modifies allergen-induced immune responses in allergic rhinitis. **Clinical and Experimental Allergy**, v.38, n.8, p.1282-1289, 2008.

JACOB, F.; LWOFF, A.; SIMINOVITCH, A.; WOLLMAN, E. Définition de quelques termes relatifs a la lysogénie. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 84, p. 222-224, 1953.

JALALI, M.; ABEDI, D. Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, n. 3, p. 336-340, 2008.

JANAKIRAMAN, V. Listeriosis in pregnancy: diagnosis, treatment, and prevention. **Reviews in Obstetrics and Gynecology**, v. 1, n. 4, p. 179, 2008.

JEEVARATNAM, K.; JAMUNA, M.; BAWA, A. S. Biological preservation of foods - Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 446-454, 2005.

- JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 25, n. 2, p. 571-580, 2006.
- JENSEN, A.; FREDERIKSEN, W.; GERNER-SMIDT, P. Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989-1990. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, n. 2, p. 171-178, 1994.
- JEYALETCHUMI, P.; TUNUNG, R.; MARGARET, S.P.; SON, R.; GHAZALI, F.M.; CHEAH, Y.K.; NISHIBUCHI, M.; NAKAGUCHI, Y.; MALAKAR, P.K. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salad vegetables by MPN PCR. **International Food Research Journal**, v. 17, n. 2, p. 281-286, 2010.
- JIANZHONG, Z.; XIAOLI, L.; HANHU, J.; MINGSHENG, D. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 26, p. 770-775, 2009.
- KARTHIKEYAN, V.; SANTHOSH, S.W. Study of bacteriocin as a food preservative and the *L. acidophilus* strain as probiotic. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, n. 4, p. 335-340, 2009.
- KASALICA, A.; VUKOVIĆ, V.; VRANJEŠ, A.; MEMIŠI, N. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 27, n. 3, p. 1067-1082, 2011.
- KECHAGIA, M.; BASOULIS, D.; KONSTANTOPOULOU, S.; DIMITRIADI, D.; GYFTPOULOU, K.; SKARMOUSOU; FAKIRI, E.M. Health benefits of probiotics: a review. **ISRN Nutrition**, v. 2013, Article ID 481651, 7 pages, 2013.
- KESMEN, Z.; KACMAZ, N. Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods. **Journal of Food Science**, v.76, n.5, p.276-283, 2011.
- KHALID, K. An overview of lactic acid bacteria. **International Journal of Biosciences**, v.1, n.3, p.1-13, 2011.
- KHAY, E.O.; IDAOMAR, M.; CASTRO, L.M.P.; BERNÁRDEZ, P.F.; SENHAJI, N.S.; ABRINI, J. Antimicrobial activities of the bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria isolated from Moroccan dromedary milk. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 51, p. 10447-10455, 2011.
- KOEBNICK, C.; WAGNER, I.; LEITZMANN, P.; STERN, U.; ZUNFT, H.J.F. Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v.17, n.11, p.655-660, 2003.
- KOJIĆ, M.; LOZO, J.; BEGOVIĆ, J.; JOVČIĆ, B.; TOPISIROVIĆ, L. Characterization of lactococci isolated from homemade kefir. **Archives of Biological Sciences**, v. 59, n. 1, p. 13-22, 2007.
- KREANDER, K.; VUORELA, P.; TAMMELA, P. A rapid screening method for detecting active compounds against erythromycin-resistant bacterial strains of Finnish origin. **Folia Microbiologica**, v. 50, n. 6, p. 487-493, 2005.
- KROONEMAN, J.; FABER, F.; ALDERKAMP, A.C.; OUDE ELFERINK, S.J.H.W.; DRIEHUIS, F.; CLEENWERCK, I.; SWINGS, J.; GOTTSCHAL, J.C.; VANCANNEYT, M. *Lactoobacillus diolivorans* sp.nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.639-646, 2002.
- LADO, B.H.; YOUSEF, A.E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: RYSER, E.T.; MARTH E.H. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 3rd.ed. Boca Raton: CRC Press Taylor e Francis Group, 2007. chap. 6, p.157-213.
- LANGFIELD, R.D.; SCARANO, F.J.; HEITZMAN, M.E.; KONDO, M.; HAMMOND, G.B.; NETO, C.C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2, p. 279-281, 2004.
- LAU, A.S.Y.; LIONG, M.T. Lactic acid bacteria and Bifidobacteria - Inhibited *Staphylococcus epidermidis*. **Wounds**, v. 25, n. 6, p. 121-131, 2014.
- LECUIT, M. Human listeriosis and animal models. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1216-1225, 2007.

- LEITE, A.M.O.; MAYO, B.; RACHID, C.T.C.C.; PEIXOTO, R.S.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F.; DELGADO, S. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. **Food Microbiology**, v. 31, p. 215-221, 2012.
- LEITE, A.M.O.; LEITE, D.C.A.; DEL AGUILA, E.M.; ALVARES, T.S.; PEIXOTO, R.S.; MIGUEL, M.A.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **Journal of Dairy Science**, v.96, n.7, p.4149-4159, 2013^a.
- 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^b.
- LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science e Technology**, v.15, p.67-78, 2004.
- LI, J.; ZHANG, W.; WANG, C.; YU, Q.; DAI, R.; PEI X. *Lactococcus lactis* expressing food-grade β -galactosidase alleviates lactose intolerance symptoms in post-weaning Balb/c mice. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.96, p.1499-1506, 2012.
- LIANOU, A.; SOFOS, J.N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. **Journal of Food Protection**®, v. 70, n. 9, p. 2172-2198, 2007.
- LILLEY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p.747-748, 1965.
- LINNAN, M.J.; MASCOLA, L.; LOU, X.D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C.; HIRD, D.W.; YONEKURA, M.L.; HAYES, P.; WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLIKAYTIS, B.D; FANNIN, S.L.; KLEKS, A.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 13, p. 823-828, 1988.
- LISERRE, A.M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage. **Meat Science**, v. 61, n. 4, p. 449-455, 2002.
- LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 645-659, 2006.
- LIUTKEVIČIUS, A.; ŠARKINAS, A. Studies on the growth conditions and composition of kefir grains - as a food and forage biomass. **Dairy Science Abstracts**, v. 66, p. 903, 2004.
- LOCATELLI, A.; SPOR, A.; JOLIVET, C.; PIVETEAU, P.; HARTMANN, A. Biotic and abiotic soil properties influence survival of *Listeria monocytogenes* in soil. **PLoS one**, v. 8, n. 10, p. e75969, 2013.
- LOGUERCIO, A P.; SILVA, W.P.; ALEIXO, J.A.G.; COSTA, M.M.; VARGAS, A.C. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, v.15, n. 80/81, p. 39-48, 2001.
- LÓPEZ-DÍAZ, T.M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L.; MORENO B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, v.17, n.1, p.23-32, 2000.
- LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, p. 67-74, 2006.
- LÜCKE, F.K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v.56, p.105-115, 2000.
- LYYTIKÄINEN, O.; AUTIO, T.; MAIJALA, R.; RUUTU, P.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; MIETTINEN, M.; HATAKKA, M.; MIKKOLA, J.; ANTTILA, V.J.; JOHANSSON, T.; RANTALA, L.; AALTO, T.; KORKEALA, H.; SIITONEN, A. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1838-1841, 2000.

- MACEDO, R.E.F. **Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo fermentado**. 2005. 198p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- MCLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R.T.; SMERDON, W.J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 15-33, 2004.
- MAGALHÃES, K.T.; PEREIRA, G.V.M.; DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1241-1250, 2010.
- MAGALHÃES, K.T.; PEREIRA, G.V.M.; CAMPOS, C.R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R.F. Brazilian kefir: microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 693-702, 2011.
- MAGRO, M.L.M.; CORBACHO, J.M.M.; HERRANZ, C.S.; SUÁREZ, A.M.G.; RODRÍGUEZ, J.M.G. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. **Alimentaria**, v.37, p.67-74, 2000.
- MAQUEDA, M.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; FERNÁNDEZ, M.; MONTALBÁN-LÓPEZ, M.; VALDIVIA, E.; MARTÍNEZ-BUENO, M. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 1, p. 2-22, 2008.
- MARKKULA, A.; AUTIO, T.; LUNDEN, J.; KORKEALA, H. Raw and processed fish show identical *Listeria monocytogenes* genotypes with pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Food Protection®**, v. 68, n. 6, p. 1228-1231, 2005.
- MARSH, A.J.; O'SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R.P.; COTTER, P.D. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. **PLoS one**, v. 8, n. 7, p. e69371, 2013.
- MARTEAU, P.R.; DE VRESE, M.; CELLIER, C.J.; SCHREZENMEIR, J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.4305-4365, 2001.
- MASSAGUER, P.R. **Microbiologia de Processos Alimentares**. São Paulo: Varela, 2005.
- MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J.; DROSINOS, E. H. Characterization of two bacteriocins produced by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442, isolated from dry fermented sausages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, n.9, p.847-856, 2002.
- MATARAGAS, M.; DROSINOS, E.H.; METAXOPOULOS, J. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2° C. **Food Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 259-265, 2003.
- MCBRIDE, J.; INGRAM, P.R.; HENRIQUEZ, F.L.; ROBERTS, C.W. Development of colorimetric microtiter plate assay for assessment of antimicrobials against *Acanthamoeba*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 629-634, 2005.
- MCLAUGHLIN, J.; REES, C.E.D. Genus I. *Listeria*. In: VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.A.; SCHLEIFER, K.H.; WHITMAN, W.B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes**. 2nd ed. New York, USA: Springer, 2009, p. 244-256.
- MEHTA, R.; ARYA, R.; GOYAL, K.; SINGH, M.; SHARMA, A.K. Bio-preservative and Therapeutic Potential of Pediocin: Recent Trends and Future Perspectives. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 172-178, 2013.
- MELO, N.R.; SOARES, N.F.F.; GONÇALVES, M.P.J.C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 52, n. 303, p. 921-938, 2005.

- MESQUITA, M.O.D.; DANIEL, A.P.; SACCOL, A.L.D.F.; MILANI, L.I.; FRIES, L.L. Qualidade microbiológica no processamento do frango assado em unidade de alimentação e nutrição. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 198-203, 2006.
- MIGUEL, M.G.C.P.; CARDOSO, P.G.; MAGALHÃES-GUEDES, K.T.; SCHWAN, R.F. Identification and assessment of kefir yeast potential for sugar/ethanol-resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 113-118, 2013.
- MILLETTE, M.; LUQUET, F.M.; LACROIX, M. *In vitro* growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacillus casei*-fermented milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 314-319, 2006.
- MOGENSEN, G.; SALMINEN, S.; O'BRIEN, J.; OUWEHAND, A.; HOLZAPFEL, W.; SHORTT, C.; FONDEN, R.; MILLER, G.D.; DONOHUE, D.; PLAYNE, M.; CRITTENDEN, R.; BIANCHI SALVADORI, B.; ZINK, R. Inventory of microorganisms with a documented history of use in food. **Bulletin - International Dairy Federation**, n. 377, p. 10-19, 2002.
- MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, v. 1, n. 2, p. 107-121, 2004.
- MURRAY, E.G.D.; WEBB, R.A.; SWANN, M.B.R. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). **Journal of Pathology and Bacteriology**, n. 29, p. 407-439, 1926.
- NADON, C.A.; WOODWARD, D.L.; YOUNG, C.; RODGERS, F.G.; WIEDMANN, M. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2704-2707, 2001.
- NASCIMENTO, M.S.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 120-127, 2008.
- NES, I.F.; DIEP, D.B.; HÅVARSTEIN, L.S.; BRURBERG, M.B.; EIJSINK, V.; HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 70, n. 2-4, p. 113-128, 1996.
- NIGHTINGALE, K.K.; SCHUKKEN, Y.H.; NIGHTINGALE, C.R.; FORTES, E.D.; HO, A.J.; HER, Z.; GROHN, Y.T.; MCDONOUGH, P.L.; WIEDMANN, M. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4458-4467, 2004.
- NWUCHE, C.O. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from 'Ugba' and 'Okpiye', two locally fermented nigerian food condiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 1, p. 101-106, 2013.
- OGIER, J. C.; CASALTA, E.; FARROKH, C.; SAÏHI, A. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p. 286-290, 2008.
- OKDA, A.Y.; YEHA, H.A.; EL KHOLY, W.I.; HOSNY, I.M. Antibacterial activity of Kefir cultural metabolites against some food-borne pathogens and their survival in Kefir-Tallaga cheese. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, n. 6, p. 4114-4124, 2013.
- OLIVEIRA, G.F.D.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA FILHO, A.A.D.; MARTINS, C.H.G.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 381-384, 2007.
- OLIVEIRA, R.B.P.; OLIVEIRA, A.; GLÓRIA B.M. Screening of lactic acid bacteria from vacuum packaged beef for antimicrobial activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.368-374, 2008.
- OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 54-59, 2003.

- PAPAMANOLI, E.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; KOTZEKIDOU, P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science**, v.65, p.859-867, 2003.
- PASTEUR, L.; JOUBERT, J.F. Charbon et septicémie. **Comptes-rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales**, v. 85, p. 101-115, 1877.
- PATRICK, O.M. Lactic acid bacteria in health and disease. **Rwanda Journal of Health Sciences**, v.1, n.1, p.39-50, 2012.
- PĂUCEAN, A.; SOCACIU, C. Probiotic activity of mixed cultures of kefir's lactobacilli and non-lactose fermenting yeasts. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture**, v. 65, n. 2, 2008.
- PEARSON, L.J.; MARTH, E.H. *Listeria monocytogenes* -Threat to a Safe Food Supply: A Review. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 4, p. 912-928, 1990.
- PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Science**, v.67, n.2, p.309-317, 2004.
- PINGITORE, E.V.; TODOROV, S.D.; SESMA, F.; FRANCO, B.D.G.M. Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. **Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 38-47, 2012.
- POT, B.; TSAKALIDOU, E. Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus*. In LJUNGH A.; WADSTROM, T. **Lactobacillus molecular biology: from genomics to probiotics**. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009, p. 3-59.
- POWELL, J.E.; WITTHUHN, R.C.; TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 190-198, 2007.
- PUERTOLLANO, E.; PUERTOLLANO, M.A.; CRUZ-CHAMORRO, L.; DE CIENFUEGOS, G.A.; RUIZ-BRAVO, A.; DE PABLO, M.A. Effects of concentrated supernatants recovered from *Lactobacillus plantarum* on *Escherichia coli* growth and on the viability of a human promyelocytic cell line. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1194-1203, 2009.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, A.K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, n. 1, p. 3-11, 2002.
- RAHIMZADEH, G.; BAHAR, M.; MOZAFFARI, N.A. Antimicrobial activity Kefir on different time fermentation. **Iran Journal of Medical Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 35-41, 2012.
- RAJA, A.; GAJALAKSHMI, P.; RAJA, M.M.M.; IMRAN, M.M. Effect of *Lactobacillus lactis cremoris* isolated from kefir against food spoilage bacteria. **American Journal of Food Technology**, v. 4, n. 5, 2009.
- RAMASWAMY, V.; CRESENCE, V.M.; REJITHA, J.S.; LEKSHMI, M.U.; DHARSANA, K.S.; PRASAD, S.P.; VIJILA, H. M. *Listeria* - review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**, v. 40, n. 1, p. 4, 2007.
- RAMIREZ, J.C.R.; ULLOA, P.R.; VELASQUEZ, G.; ULLOA, J.A.; ROMERO, F.A. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. **Revista Fuente**, Nayrit, v.2, n.7, 2011.
- RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. **Annals of Biological Research**, v.1, n.4, p.218-228, 2010.
- REA, M.C.; DOBSON, A.; O'SULLIVAN, O.; CRISPIE, F.; FOUHY, F.; COTTER, P.D.; SHANAHAN, F.; KIELY, B.; HILL, C.; ROSS, R.P. Effect of broad-and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile*

and microbial diversity in a model of the distal colon. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, suppl. 1, p. 4639-4644, 2011.

REID, G.; HAMMOND, J.A. Probiotics: some evidence of their effectiveness. **Canadian Family Physician**, v.51, p.1487-1493, 2005.

RHOADES, J.R.; DUFFY, G.; KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enteric* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review. **Food Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 357-376, 2009.

RILEY, M.A.; WERTZ, J.E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 117-137, 2002.

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic position, taxonomy and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH E.H. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press Taylor e Francis Group, 2007. cap. 1, p.1-20.

ROCOURT, J.; JACQUET, C.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 197-209, 2000.

RODAS, A.M.; FERRER, S.; PARDO, I. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. **Systematic and Applied Microbiology**, v.26, p.412-422, 2003.

RODAS, A.M.; FERRER, S.; PARDO, I. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.197-207, 2005.

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**, v. 25, p. 404-408, 2005.

RODRÍGUEZ, E.; ARQUÉS, J.L.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 68, n. 1, p. 131-137, 2001.

RODRÍGUEZ, E.; CALZADA, J.; ARQUÉS, J.L.; RODRÍGUEZ, J.M.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. **International Dairy Journal**, v.15, n.1, p.51-57, 2005.

ROSA, C.M.; FRANCO, B.D.G.M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **Conscientiae Saúde**, v. 1, p. 09-15, 2002.

ROSS, R. P.; GALVIN, M.; MCAULIFFE, O.; MORGAN, S.M.; RYAN, M.P.; TWOMEY, D.P.; MEANEY, W.J.; HILL, C. Developing applications for lactococcal bacteriocins. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 337-346, 1999.

ROZOY, E.; BAZINET, L.; ARAYA-FARIAS, M.; GUERNEC, A.; SAUCIER, L. Inhibitory effects of commercial and enriched green tea extracts on the growth of *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. **Journal of Food Research**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2013.

RUSMANA, I.; SUWANTO, A.; MUBARIK, R.; NISA, D. Characterization of lactic acid bacteria isolated from an Indonesian fermented fish (bekasam) and their antimicrobial activity against pathogenic bacteria. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 25, n. 6, p. 489-494, 2013.

RUSSO, G.; IANNETTA, M.; D'ABRAMO, A.; MASCELLINO, M.T.; PANTOSTI, A.; ERARIO, L.; TEBANO, G.; OLIVA, A.; D'AGOSTINO, C.; TRINCHIERI, V.; VULLO, V. *Lactococcus garvieae* endocarditis in a patient with colonic diverticulosis: first case report in Italy and review of the literature. **New Microbiologica**, v.35, n.4, p.495-501, 2012.

- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.84, n.3, p.197-215, 2000.
- SAAVEDRA, L.; MINAHK, C.; DE RUIZ HOLGADO, A. P.; SESMA, F. Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH2-terminal sequence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2778-2781, 2004.
- SABIR, F.; BEYATLI, Y.; COKMUS, C.; ONAL-DARILMAZ, D. Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. strains isolated from kefir. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, p. 568-573, 2010.
- SAMARŽIJA, D.; ANTUNAC, N.; LUKAČ HAVRANEK, J. Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. **Mljekarstvo**, v.51, n.1, p.35-48, 2001.
- SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, New York, v.61, n.3, p.91-99, 2003.
- SANDERS, M.E. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. Supplement 2, p. S58-S61, 2008.
- SANT'ANNA, V.; QUADROS, D.A.; MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Antibacterial activity of bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* in chicken sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1163-1167, 2013.
- 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 and Applied Microbiology**, v. 26, p. 434-437, 2003.
- SANTOS, J.P.V.; ARAÚJO, T.F.; FERREIRA, C.L.L.F; GOULART, S.M. Evaluation of antagonistic activity of milk fermented with kefir grains of different origins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 5, p. 823-827, 2013.
- SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage - a review. **British Food Journal**, v. 109, p. 280-290, 2007.
- SAVADOGO, A.; OUATTARA, C.A.T.; BASSOLE, I.H.N.; TRAORE, S.A. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. **African Journal of Biotechnology**, 2006, v.5, n.9, p.678-683, 2006.
- SAVINO, F.; CORDISCO, L.; TARASCO, V.; LOCATELLI, E.; DI GIOIA, D.; OGGERO, R.; MATTEUZZI, D. Antagonistic effect of *Lactobacillus* strains against gas-producing coliforms isolated from colicky infants. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 157, 2011.
- SAWA, N.; OKAMURA, K.; ZENDO, T.; HIMENO, K.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* QU 15. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, n.1, p.282-291, 2010.
- SCALLAN, E.; GRIFFIN, P.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; HOEKSTRA, R. M. Foodborne illness acquired in the United States - unspecified agents. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 16, 2011.
- SCHLECH, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J.; HIGHTOWER, A.W.; JOHNSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.S.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis: Evidence for transmission by food. **The New England Journal of Medicine**, v. 308, n. 4, p. 203-206, 1983.
- SCHLEIFER, K.H.; KRAUS, J.; DVORAK, C.; KILPPER-BALZ, R.; COLLINS, M.D.; FISCHER, W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v.6, p.183-195, 1985.

- SCHÖBITZ, R.; GONZÁLEZ, C.; VILLARREAL, K.; HORZELLA, M.; NAHUELQUÍN, Y.; FUENTES, R. A biocontroller to eliminate *Listeria monocytogenes* from the food processing environment. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 217-223, 2014.
- SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.361S-364S, 2001.
- SCHULZ, D.; PEREIRA, M.A.; BONELLI, R.R.; NUNES, M.M.; BATISTA, C.R.V. Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 14, n. 2, p.229-235, 2003.
- SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I.A. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunistoquímica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 2, 2003.
- SERVIN, A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 4, p. 405-440, 2004.
- SETTANNI, L.; MASSITTI, O.; VAN SINDEREN, D.; CORSETTI, A. *In situ* activity of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strain. Influence on the interactions between lactic acid bacteria during sourdough fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 670-681, 2005.
- SILVA, K.R.; RODRIGUES, S.A.; XAVIER FILHO, L.; LIMA, Á. S. Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, n. 2, p. 316-325, 2009.
- 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 Análises Microbiológicas de Alimentos e Água**. 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 552 p.
- SIRIRAT, D.; JELENA, P. Bacterial inhibition and antioxidant activity of kefir produced from Thai jasmine rice milk. **Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 332-337, 2010.
- ŠINKO, S.; ZAMBERLIN, Š.; SAMARŽIJA, D. Microbiota of kefir grains. **Mljekarstvo**, v. 63, n. 1, p. 3-14, 2013.
- SMIT, G.; SMIT, B.A.; ENGELS, W.J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.591-610, 2005.
- SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, 2007.
- TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of gram positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 40, p. 722-756, 1976.
- TAHERI, P.; SAMADI, N.; KHOSHAYAND, M.R.; FAZELI, M.R.; JAMALIFAR, H.; EHSANI, M.R. A study on the antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian milk samples. **International Journal of Agricultural Science and Research**, v. 2, n. 1, p. 27-34, 2011.
- TAKEDA, K.; OKUMURA, K. Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the human NK-cell activity. **The Journal of Nutrition**, v.137, n.3, p.791S-793S, 2007.
- TANNOCK, G.W. A Special Fondness for *Lactobacilli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.6, p. 3189-3194, 2004.
- THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. **International Food Research Journal**, v. 16, p. 261-276, 2009.
- THÉVENOT, D.; DERNBURG, A.; VERNOSY-ROZAND, C. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 7-17, 2006.

- THOMAS, L.V.; CLARKSON, M.R.; DELVIS-BROUGHTON, J. Nisin. In: NAIDU, A.S. **Natural food antimicrobial systems**. Boca Raton: CRC Press, 2000. cap. 18, p.477.
- TOH, H.; OSHIMA, K.; NAKANO, A.; TAKAHATA, M. MURAKAMI, M.; TAKAKI, T.; NISHIYAMA, H.; IGIMI, S.; HATTORI, M.; MORITA, H. Genomic adaptation of the *Lactobacillus casei* group. **PLoS one**, v.8, n.10, e75073, p.1-10, 2013.
- TOYOSHIMA, M.T.K.; APANAVICIUS, A.; SOEIRO, A.M.; ALMEIDA, G.M.D.; ARAI, M.H. *Listeria monocytogenes* peritonitis in cirrhotic patients: first description in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 5, p. 291-293, 2006.
- TRIAS, R.; BADOSA, E.; MONTESINOS, E.; BAÑERAS, L. Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 1, p. 91-98, 2008.
- UHITIL, S.; JAKŠIĆ, S.; PETRAK, T.; MEDIĆ, H.; GUMHALTER-KAROLYI, L. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. **Food control**, v. 15, n. 3, p. 213-216, 2004.
- ULUSOY, B.H.; ÇOLAK, H.; HAMPIKYAN, H.; ERKAN, M.E. An *in vitro* study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens. **Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi**, v. 37, n. 2, p. 103-107, 2007.
- ÜNAL, B.U.; ARSLANOĞLU, A. Phylogenetic identification of bacteria within kefir by both culture-dependent and culture-independent methods. **African Journal of Microbiology Research**, v.7, n.36, p.4533-4538, 2013.
- VAILLANT, V.; MAILLOT, E.; CHARLEY, C.; STAINER, F. Epidémie de listériose, France Avril-Août 1995. **Saint-Maurice, France: Rapport du Réseau National de Santé Publique**, p. 1-58, 1998.
- VALGAS, C.; SOUZA, S.M.D.; SMÂNIA, E.F.; SMÂNIA JR, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 369-380, 2007.
- VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M., L. Levantamentos de dados epidemiológicos relativos à ocorrência/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) no Estado do Paraná - Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.
- VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117-1131, 2010.
- VASCONCELOS, V.H.R. **Ensaio sobre a importância do treinamento para manipuladores de alimentos nos serviços de alimentação baseada na RDC Nº 216/2004**. 2008. 40p. Monografia de especialização apresentada ao Curso de Especialização em Gastronomia e Saúde. Centro de Excelência em Turismo, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- VÁSQUEZ, S.M.; SUÁREZ, H.; ZAPATA, S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas em la conservación de la carne. **Revista Chilena de Nutrición**, v.36, n.1, p.191-200, 2009.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584-640, 2001.
- WAGNER, M.; MCLAUHLIN, J. Biology. In: LIU, D. **Handbook of Listeria monocytogenes**. New York, USA: CRC Press, 2008, p. 3-26.
- WAN, X.; LI, R.; SARIS, P.E.J.; TAKALA, T.M. Genetic characterisation and heterologous expression of leucocin C, a class IIa bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* 4010. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, v.97, p. 3509-3518, 2012.
- WARRINER, K.; NAMVAR, A. What is the hysteria with *Listeria*? **Trends in Food Science e Technology**, v. 20, n. 6, p. 245-254, 2009.

WATANABE, Y.; NAITO, T.; KIKUCHI, K.; AMARI, Y.; UEHARA, Y.; ISONUMA, H.; HISAOKA, T.; YOSHIDA, T.; YAGINUMA, K.; TAKAYA, N.; DAIDA, H.; HIRAMATSU, K. Infective endocarditis with *Lactococcus garvieae* in Japan: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v.5, p.1-4, 2011.

WELKER, C.A.D.; BOTH, J.M.C.; LONGARAY, S.M.; HAAS, S.; SOEIRO, M.L.T.; RAMOS, R.C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Brazilian Journal of Biosciences**, v.8, n.1, p.44-48, 2010.

WESCHENFELDER, S.; PEREIRA, G.M.; CARVALHO, H.H.C.; WIEST, J.M.. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 473-480, 2011.

WIEDMANN, M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 2, p. 524-531, 2002.

WINSLOW, C.E.A.; BROADHURST, J.; BUCHANAN, R.E.; KRUMWIEDE, C.; ROGERS, L.A.; SMITH, G.H. Genus I. *Lactobacillus*. In: VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.A.; SCHLEIFER, K.H.; WHITMAN, W.B. **Bergey's manual of systematic bacteriology: The Firmicutes**, 2nd ed., Vol.3. New York, NY: Springer, 2009, p.465-510.

WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 1, p. 33-37, 2004.

WSZOLEK, M.; TAMIME, A.Y.; MUIR, D.D.; BARCLAY, M.N.I. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 251-261, 2001.

YANG, E.; FAN, L.; JIANG, Y.; DOUCETTE, C.; FILLMORE, S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2012.

YDE, M.; NARANJO, M.; MATTHEUS, W.; STRAGIER, P.; POCHET, B.; BEULENS, K.; YU, J.; WANG, W.H.; MENGHE, B.L.G.; JIRI, M.T.; WANG, H.M.; LIU, W.J.; BAO, Q.H.; LU, Q.; ZHANG, J.C.; WANG, F.; XU, H.Y.; SUN, T.S.; ZHANG, H.P. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.3229-3241, 2011.

YÜKSEKDAĞ, Z.N.; BEYATH, Y.; ASLIM, B. Metabolic activities of *Lactobacillus* spp. strains isolated from kefir. **Food/Nahrung**, v. 48, n. 3, p. 218-220, 2004.

YUSUF, M.A.; HAMID, T.A.T.A. Optimization of temperature and pH for the growth and bacteriocin production of *Enterococcus faecium* B3L3. **Optimization**, v. 2, n. 6, p. 49-59, 2012.

ZACHAROF, M.P.; LOVITT, R.W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 50-56, 2012.

ZAMFIR, M.; CALLEWAERT, R.; CORNEA, P.C.; VUYST, L. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, n. 2, p. 305-308, 2000.

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 cultivos**. 2012. 77p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2012.

ZECHINI, B.; CIPRIANI, P.; PAPADOPOULOU, S.; DI NUCCI, G.; PETRUCCA, A.; TEGGI, A. Endocarditis caused by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in a patient with atrial myxoma: a case report. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.56, n.3, p.325-328, 2006.

ZOUHIR, A.; HAMMAMI, R.; FLISS, I.; HAMIDA, J.B. A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. **The Protein Journal**, v. 29, n. 6, p. 432-439, 2010.

ZUBILLAGA, M.; WEILL, R.; POSTAIRE, E.; GOLDMAN, C.; CARO, R.; BOCCIO, J. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. **Nutrition Research**, v. 21, n. 3, p. 569-579, 2001.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A - Classificação de bacteriocinas de bactérias lácticas (BAL)

CLASSE/ CARACTERÍSTICAS	TIPO	GRUPO REPRESENTATIVO	REFERÊNCIA
I (Lantibióticos) Peptídeos inativos submetidos a modificações pós-traducionais; pequenos (<5 kDa), termostáveis, com presença de aminoácidos tio éter não usuais, como lantionina e β-metillantionina	Tipo A Moléculas alongadas, flexíveis, de carga positiva e anfipáticas. Massa molecular entre 2-4 kDa. Modo de ação contra célula alvo por meio de despolarização de membrana citoplasmática.	Nisina, subtilina, epidermina, lacticina 3147	Eijsink <i>et al.</i> , 2002; Riley e Wertz, 2002; Ghanbari <i>et al.</i> , 2009; Asaduzzaman <i>et al.</i> , 2011; Cotter <i>et al.</i> , 2013.
	Tipo B Moléculas de estrutura globular, de carga neutra ou negativa. Massa molecular entre 2-3 kDa. Modo de ação contra célula alvo por meio de inibição enzimática.	Nukacina ISK-1, mutacina II, lacticina 481, mersacidina	Eijsink <i>et al.</i> , 2002; Riley e Wertz, 2002; Asaduzzaman <i>et al.</i> , 2011.
II (Não lantibióticos) Peptídeos pequenos (< 10 kDa), termostáveis, sem conteúdo de lantionina	II a Peptídeos não modificados, contendo de 37-48 aminoácidos edistinguidos por sequência N-terminal (YGNGVXC). São peptídeos similares à pediocina PA-1, cujo modo de ação ocorre por formação de poros na membrana citoplasmática. Apresentam ação contra <i>Listeria</i> spp.	Pediocina PA-1, sakacinas A e P, leucocina A, carnobacteriocina B2	Eijsink <i>et al.</i> , 2002; Riley e Wertz, 2002; De Vuyst e Leroy, 2007; Ghanbari <i>et al.</i> , 2009; Zacharoff e Lovitt, 2012; Cotter <i>et al.</i> , 2013.
	II b Bacteriocinas compostas por dois peptídeos diferentes. Modo de ação ocorre por formação de poros compostos por meio da ação sinérgica de ambos os peptídeos em membranas de células alvo.	Lactococcinas G e F, lactacina F	Eijsink <i>et al.</i> , 2002; Riley e Wertz, 2002; De Vuyst e Leroy, 2007; Zacharoff e Lovitt, 2012; Cotter <i>et al.</i> , 2013.
	II c Peptídeos cíclicos, que requerem a presença de resíduos de cisteína na forma reduzida para atividade biológica da molécula.	Lactococcina B, enterocina AS-48	Eijsink <i>et al.</i> , 2002; Riley e Wertz, 2002; De Vuyst e Leroy, 2007; Cotter <i>et al.</i> , 2013.
III Proteínas de elevado peso molecular (> 30 kDa), termolábeis	----	Helveticinas J e V, enterolisina, lactacinas A e B	Eijsink <i>et al.</i> , 2002; Riley e Wertz, 2002; De Vuyst e Leroy, 2007; Ghanbari <i>et al.</i> , 2009; Zacharoff e Lovitt, 2012
IV Moléculas complexas que contêm, além da porção protéica, porções lipídicas ou de carboidratos	----	Leuconocina S, lactocina 27	Riley e Wertz, 2002.

APÊNDICE B - Principais surtos globais de listeriose, 1979-2011

DATA/ LOCALIZAÇÃO	Nº DE CASOS (% MORTALIDADE)	ALIMENTO (S) ENVOLVIDO (S)	SOROTIPO	FATORES DE RISCO	REFERÊNCIA
1979 Estados Unidos	23 (15%)	Verduras (cenoura, alface, rabanete)	4b	Imunossuprimidos (câncer, quimioterapia, tratamento esteroideal), uso de antiácidos, cimetidina	Ho <i>et al.</i> , 1986
1981 Províncias Marítimas, Canadá	41 (41%)	Repolho cru	4b	Gravidez	Schlech <i>et al.</i> , 1983
1983 Estados Unidos	49 (29%)	Leite integral pasteurizado	4b	Câncer, alcoolismo, terapiacorticoe esteroideal munossuprimidos	Fleming <i>et al.</i> , 1985
1985 Estados Unidos	142 (33%)	Queijo macio Tipo mexicano	4b	Gravidez, câncer, terapia esteroideal, AIDS	Linnan <i>et al.</i> , 1988
1983-1987 Suíça	122 (29%)	Queijo macio tipo Vacherin Mont-d'Ôr	4b	Gravidez, imunossuprimidos (idoso)	Bille, 1990; Büla <i>et al.</i> , 1995
1989-1990 Dinamarca	26 (26%)	Queijo macio tipo Azul Dinamarquês	4b	Gravidez, imunossuprimidos (leucemia, linfoma, transplante renal)	Jensen <i>et al.</i> , 1994
1995 França	36 (0%)	Queijo tipo Brie de Meaux	4b	Gravidez, imunossuprimidos (idoso, cirrose)	Goulet <i>et al.</i> , 1995; Vaillant <i>et al.</i> , 1998
1999 Finlândia	25 (24%)	Manteiga	3a	Malignidade, transplante	Lyytikäinen <i>et al.</i> , 2000
2003 Inglaterra	5 (0%)	Sanduíche	1/2a	Gravidez	Dawson <i>et al.</i> , 2006
2005 Suíça	10 (30%)	Queijo macio tipoTomme	1/2a	Gravidez, imunossuprimidos (idoso)	Bille <i>et al.</i> , 2006
2011 Bélgica	12 (33%)	Queijo duro feito de leite pasteurizado	1/2a	Imunossuprimidos (câncer, cirrose, comorbidades (diabetes tipo 2, doença pulmonary obstrutiva crônica)	Yde <i>et al.</i> , 2012

9. ANEXOS

ANEXO A - Padrões físico-químicos e microbiológicos do kefir

PARÂMETROS	PADRÕES
Proteína ^(a) (% m/m)	Mínimo de 2,7%
Gordura (% m/m)	Menos de 10,0 %
Acidez Titulável (em % de Ácido láctico)	Mínimo de 0,6%
Etanol (% v/m)	Não mencionado
Contagem Bacteriana Total (UFC/g)	Mínimo de 10 ⁷
Leveduras (UFC/g)	Mínimo de 10 ⁴

(a) Conteúdo protéico multiplicado por 6,38 pelo nitrogênio total determinado por Kjeldahl.

Fonte: Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO), 2003.

ANEXO B - Valores nutricionais do kefir

ATRIBUTOS NUTRICIONAIS	COMPONENTES NUTRICIONAIS	CONCENTRAÇÃO
Vitaminas (mg/Kg)	Vitamina B1	<1
	Vitamina B2	<0,5
	Vitamina B5	0,3
Aminoácidos (mg/100 g)	Treonina	0,18
	Lisina	0,38
	Valina	0,22
	Isoleucina	0,26
	Metionina	0,14
	Fenilalanina	0,23
	Triptofano	0,07
Minerais Macro elementos (%)	Potássio	1,65
	Cálcio	0,86
	Magnésio	1,45
	Fósforo	0,30
Micro elementos (mg/Kg)	Cobre	0,73
	Zinco	9,27
	Ferro	2,03
	Manganês	1,30
	Cobalto	0,02
	Molibdênio	0,03

Fonte: LIUTKEVIČIUS E ŠARKINAS (2004).