



**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA BACTERIOCINA P34 NO CRESCIMENTO DE *Listeria*  
*monocytogenes* EM LINGÜIÇA FRESCAL DE FRANGO**

**DEONI APARECIDA FERREIRA DE QUADROS**

**PORTO ALEGRE - RS**  
**2007**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DA BACTERIOCINA P34 NO CRESCIMENTO DE *Listeria*  
*monocytogenes* EM LINGÜIÇA FRESCAL DE FRANGO**

**Autor:** DEONI APARECIDA FERREIRA DE QUADROS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

**Orientador:** Prof. Dr. Adriano Brandelli

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - ICTA/UFRGS

PORTO ALEGRE – RS

2007

Q1a Quadros, Deoni Aparecida Ferreira de

Avaliação da bacteriocina P34 no crescimento de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal de frango / Deoni Aparecida Ferreira de Quadros - Porto Alegre: UFRGS, 2007.

65 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2007. Adriano Brandelli, Orient.

1. Atividade antimicrobiana 2. Bacteriocina P34  
3. *Listeria monocytogenes* 4. Lingüiça frescal de frango  
I. Brandelli, Adriano, Orient. II. Título

CDD 619.48

Catálogo na fonte preparada pela Biblioteca da  
**Faculdade de Veterinária da UFRGS**

Deoni Aparecida Ferreira de Quadros

**AVALIAÇÃO DA BACTERIOCINA P34 NO CRESCIMENTO DE *Listeria monocytogenes* EM LINGÜIÇA FRESCAL DE FRANGO**

**Aprovada em**

**APROVADO POR:**

---

**Prof. Dr.º. Guiomar Pedro Bergmann**  
**Membro da Comissão**

---

**Prof. Dr.º. Plinho Francisco Hertz**  
**Membro da Banca**

---

**Prof. Dr.º. Elci Lotar Dickel**  
**Membro da Banca**

A Deus, Infinito de Luz e Energia que rege todas as coisas, aos meus pais, Antonio Silveira de Quadros (*in memoriam*) e Doreni Ferreira Bastos, que formaram minha conduta e aos espíritos de luz que me guiaram.

## AGRADECIMENTOS

Aos professores do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos e da Faculdade de Veterinária, em especial ao meu orientador Adriano Brandelli pela oportunidade única, confiança, solidariedade e compreensão: Obrigada! Aos professores Erna, Avancini e Wiest pelas conversas de corredor e apoio incondicional.

Aos funcionários do ICTA, em especial à Luísa, pelo ombro amigo, ao Roberval pelos “acidentes” e ao pessoal da Secretaria.

Ao Voltaire, sem você não teria acontecido! Amanda, Silvana, Florência, Roberta, Lucas, Daniel, Rosiele, Ana, Rodrigo e Mário, valeu por tudo!

À empresa BOAVE Ltda. pelo apoio e material cedido, na pessoa do Sr. André da Rosa Severo.

À Escola Michigan – Canoas, nas pessoas dos meus grandes amigos Ivan Lamb e Luís Fraga pela confiança e amizade sem limites.

Às minhas grandes amigas Guga, Ana Luisa, Bel, Daí e Marta e ao Diego Fagundes, que de uma forma ou de outra me ajudaram a concretizar esta etapa e nunca me abandonaram.

A todos os amigos que de muito longe torceram por mim, em várias cidades do Estado.

Ao Eduardo, pela cumplicidade e compreensão de tantas viagens.

À minha mãe Dorení, que provou mais uma vez ser a melhor amiga que eu poderia ter, obrigada por estar comigo me ajudando de todas as formas nestes momentos e por ter me mostrado o caminho a seguir!

# **AVALIAÇÃO DA BACTERIOCINA P34 NO CRESCIMENTO DE *Listeria monocytogenes* EM LINGÜIÇA FRESCAL DE FRANGO**

Autor: Deoni Aparecida Ferreira de Quadros

Orientador: Prof. Adriano Brandelli

## **RESUMO**

A bacteriocina P34 é produzida por um *Bacillus* sp. e apresenta atividade antimicrobiana para diversas espécies de *Listeria* sp. e para *L. monocytogenes* ATCC 7644. Neste trabalho, foi pesquisada a presença de bactérias lácticas em lingüiça fresca de frango. Os resultados demonstraram o isolamento de seis culturas em placas de ágar MRS a 30°C por 48 h. Cinco das seis linhagens isoladas inibiram o crescimento da *L. monocytogenes* após incubação a 30° C por 24 h. Os sobrenadantes brutos destas bactérias lácticas demonstraram efeito sinérgico quando adicionados em conjunto com a bacteriocina P34 frente ao microrganismo indicador, *L. monocytogenes*, pelo método de difusão em ágar com discos. Foi inoculada *L. monocytogenes* ATCC 7644 em suspensão com 10<sup>3</sup> UFC/g em lingüiça fresca de frango no dia zero e recuperada em meio MOX nos dias zero, três, sete e dez da inoculação. Os resultados permitiram concluir que a bacteriocina P34 parcialmente purificada na concentração de 256 UA/g inibiu *L. monocytogenes* em todos os tempos. A bacteriocina P34 parcialmente purificada foi testada em envoltórios naturais de bovinos (tripas semi-secas salgadas) frente ao mesmo microrganismo indicador, *L. monocytogenes* ATCC 7644, demonstrando sua inibição *in vitro*.

***EVALUATION OF BACTERIOCIN P34 ON THE GROWTH OF *Listeria monocytogenes* IN FRESH CHICKEN SAUSAGE.***

*Author: Deoni Aparecida Ferreira de Quadros*

*Advisor: Prof. Adriano Brandelli*

**ABSTRACT**

*The bacteriocin P34, produced by *Bacillus* sp., showed antimicrobial activity for many species of *Listeria* sp and *L. monocytogenes* ATCC 7644 . In this work, it was investigated the presence of lactic bacteria in fresh chicken sausage. The results demonstrated the isolation of six cultures in MRS agar plates at 30° C for 48h. Five of the six isolated strains inhibited the growing of the *L. monocytogenes* after incubation at 30°C for 24h. The crude supernatants of these lactic bacteria demonstrated the synergic effect when it were added together with the bacteriocin P34 against indicator microorganism, *L. monocytogenes* ATCC 7644, using the method of diffusion in agar with paper discs. *L. monocytogenes* ATCC 7644 was inoculated in a suspension with 10<sup>3</sup> UFC/g in chilled chicken sausage and recovered in MOX counting from zero, three, seven and ten days from the inoculation. The results allowed concluding that the P34 bacteriocin partially purified, in a 256 UA/g concentration, inhibited the indicator microorganism in all periods of time. At the same time, the partially purified P34 bacteriocin were tested in natural bovine wrapping ( salty semi-dried tripe ) using the same indicator micro-organism, *L. monocytogenes* ATCC 7644, demonstrating its inhibition in vitro.*

*1/ Essay of Master in Veterinary Science, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, january 2007 (65p).*

## LISTA DE FIGURAS

### Página

- Figura 1 - Efeito da bacteriocina P34 parcialmente purificada no crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 artificialmente inoculada em lingüiça fresca de frango. ■ – grupo com *L. monocytogenes*; ▲ - grupo com *L. monocytogenes* e bacteriocina P34 parcialmente purificada; ♦ - grupo controle. Cada ponto representa a média  $\pm$ desvio padrão de quatro determinações ..... 44
- Figura 2 - Crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 em lingüiça fresca de frango artificialmente inoculada sob tratamento com bacteriocina P34 e nisina no período de dez dias sob resfriamento..... 45
- Figura 3 - Halo de inibição de envoltório natural comestível contendo a bacteriocina P34 parcialmente purificada tratado à 4°C/30seg frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644..... 46

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Atividade da bacteriocina P34 sobre diferentes espécies e linhagens de <i>Listeria</i> spp. ....	39
Tabela 2 - Efeitos da bacteriocina P34 frente à <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644.....	40
Tabela 3 - Análise Microbiológica da lingüiça frescal de frango .....	41
Tabela 4 - Teste de antagonismo de bactérias lácticas isoladas de lingüiça frescal de frango contra <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644. ....	41
Tabela 5 - Teste de sinergismo entre sobrenadantes brutos de bactérias lácticas e bacteriocina P34 parcialmente purificada frente à <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 .....	43
Tabela 6 - Resultados de atividade da bacteriocina P34 parcialmente purificada incorporada em tripas naturais frente à <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 .....	47

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

NaCl – Cloreto de sódio

BAL – Bactérias ácido- lácticas

GRAS - generally regarded as safe

FDA - Food and Drug Administration

KDa – Quilo dáltons

FAO - Organização de Alimentos e Agricultura

OMS - Organização Mundial de Saúde

Da – dáltons

CISPOA – Coordenadoria de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal

rpm – rotações por minuto

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UA – Unidades Arbitrárias

NN – sobrenadante bruto não neutralizado

N – sobrenadante bruto neutralizado

P34+NN – Bacteriocina P34 parcialmente purificada adicionada de sobrenadante bruto não neutralizado

P34+N – Bacteriocina P34 parcialmente purificada adicionada de sobrenadante bruto neutralizado

Lm – Grupo com microrganismo *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

Nis – Grupo com bacteriocina nisina

P34+Nis – Grupo com bacteriocina P34 parcialmente purificada e bacteriocina nisina

## SUMÁRIO

Página

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Listeriose</b> .....	18
2.1.1 <i>Definição</i> .....	18
2.1.2 <i>Etiologia</i> .....	18
2.1.3 <i>Epidemiologia e Patogenia</i> .....	19
2.1.4 <i>Presença da bactéria nos alimentos cárneos</i> .....	22
2.1.5 <i>Controle de Listeria monocytogenes em alimentos</i> .....	24
<b>2.2 Bactérias Lácticas</b> .....	24
2.2.1 <i>Generalidades</i> .....	24
2.2.2 <i>Definição e características</i> .....	25
<b>2.3 Bacteriocinas</b> .....	26
2.3.1 <i>Definição</i> .....	26
2.3.2 <i>Classificação das bacteriocinas</i> .....	27
2.3.3 <i>Bactérias lácticas como produtoras de bacteriocinas</i> .....	28
2.3.4 <i>Nisina</i> .....	29
<b>2.4 Bacteriocina P34</b> .....	30
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1 Materiais</b> .....	31
3.1.1 <i>Microrganismos</i> .....	31
3.1.2 <i>Reagentes e Meios</i> .....	31
3.1.3 <i>Produto a ser testado</i> .....	31
<b>3.2 Métodos</b> .....	32

3.2.1	<i>Manutenção dos microrganismos</i> .....	32
3.2.2	<i>Obtenção da bacteriocina P34 parcialmente purificada</i> .....	32
3.2.3	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana da bacteriocina P34 parcialmente purificada em diferentes espécies de Listeria spp.</i> .....	33
3.2.4	<i>Avaliação da atividade da bacteriocina P34 parcialmente purificada em diferentes tempos de inoculação frente à L. monocytogenes ATCC 7644</i> .....	34
3.2.5	<i>Análise microbiológica da lingüiça frescal de frango</i> .....	34
3.2.6	<i>Pesquisa e isolamento de bactérias lácticas do produto</i> .....	34
3.2.7	<i>Teste de antagonismo das bactérias lácticas frente à L. monocytogenes ATCC 7644</i> .....	35
3.2.8	<i>Produção de sobrenadantes brutos de bactérias lácticas e teste de sinergismo com a bacteriocina P34 parcialmente purificada frente à L. monocytogenes ATCC 7644</i> .....	35
3.2.9	<i>Inoculação de L. monocytogenes ATCC 7644 e bacteriocina P34 parcialmente purificada em lingüiça frescal de frango</i> .....	36
3.2.10	<i>Recuperação de L. monocytogenes em lingüiça frescal de frango</i> .....	37
3.2.11	<i>Incorporação da bacteriocina P34 parcialmente purificada em envoltório natural de bovino (tripa) e avaliação de sua atividade frente à L. monocytogenes ATCC 7644</i> .....	37
3.2.12	<i>Análise Estatística</i> .....	38
4	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
4.1	<b>Atividade antimicrobiana da bacteriocina P34 parcialmente purificada em diferentes linhagens de Listeria spp.</b> .....	<b>39</b>
4.2	<b>Efeitos da bacteriocina P34 frente à L. monocytogenes ATCC 7644</b> .....	<b>40</b>
4.3	<b>Análise Microbiológica da lingüiça frescal de frango</b> .....	<b>40</b>

<b>4.4</b>	<b>Pesquisa e isolamento de bactérias lácticas da lingüiça frescal de frango</b> .....	<b>41</b>
<b>4.5</b>	<b>Verificação de sinergismo entre bactérias lácticas presentes e bacteriocina P34 parcialmente purificada</b> .....	<b>42</b>
<b>4.6</b>	<b>Avaliação da bacteriocina P34 parcialmente purificada incorporada na lingüiça frescal de frango artificialmente inoculada com <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644</b> .....	<b>43</b>
<b>4.7</b>	<b>Comparação dos efeitos da nisina e bacteriocina P34 parcialmente purificada em lingüiça frescal de frango artificialmente inoculada com <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644</b> .....	<b>45</b>
<b>4.8</b>	<b>Avaliação da bacteriocina P34 adsorvida em envoltório de lingüiça frescal de frango frente à <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644</b> .....	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>54</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As mudanças nos hábitos alimentares, o aparecimento de novos produtos do tipo "prontos para consumo" e minimamente processados, o aumento no número de refeições coletivas e o surgimento de novos processos de criação intensiva de animais têm feito com que o risco de surtos de doenças transmitidas por alimentos aumente e microrganismos pouco freqüentes entrem em evidência, principalmente, quando se consideram indivíduos imunodeprimidos, idosos, crianças e neonatos, gestantes e enfermos com doenças degenerativas crônicas ou agudas.

A busca ininterrupta por substâncias que possam ser utilizadas como conservadores alimentares não tóxicos, que não interfiram nas características organolépticas e sensoriais dos produtos finais são preocupação constante, em particular para os alimentos cárneos processados.

O abate de frangos, no Brasil, aumentou nos últimos anos, sendo que parte desta carne é transformada em lingüiça frescal, produto altamente susceptível do ponto de vista sanitário uma vez que, é altamente manipulada e comercializada sob resfriamento onde, muitas vezes, não leva adição de culturas iniciadoras como biopreservativos.

A bactéria *Listeria monocytogenes* é o agente etiológico da listeriose, uma doença contraída principalmente pelo consumo de alimentos contaminados. A taxa de mortalidade associada com a doença pode chegar a 30% em populações suscetíveis, como mulheres grávidas, recém-nascidos e indivíduos imunodeprimidos.

No Brasil, as informações referentes à vigilância epidemiológica dos casos de listeriose assim como dados relativos ao isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos ainda são escassos. Entretanto, *L. monocytogenes* tem sido associada epidemiologicamente ao consumo de carnes e produtos cárneos sendo que várias linhagens já foram isoladas destes, pois estes alimentos permitem a multiplicação do patógeno e podem servir de veículo primário para a transmissão de listeriose. O controle de *L. monocytogenes* em produtos cárneos, principalmente carne de frango, pode ser realizado por meio de intervenções físicas e químicas, higiene e sanitização, que incluem programas de autocontrole industriais visando atender às exigências sanitárias na área de alimentos, como Boas Práticas de Fabricação, Análise de Pontos Críticos de Controle, entre outras, e o uso de alguns aditivos alimentares. Porém, *L. monocytogenes*

pode multiplicar-se em ampla faixa de pH, de concentrações de sal, de temperatura e de atividade de água, e somente a aplicação dessas intervenções pode não ser eficiente para eliminar esta bactéria em caso de contaminação pós-processamento.

A incorporação de substância antimicrobiana do tipo bacteriocina nos alimentos cárneos, principalmente de frango, pode ser um método eficiente para redução dos níveis de *L. monocytogenes* em alimentos embutidos como a lingüiça frescal de frango. Contudo, existe pouca informação sobre o comportamento de *L. monocytogenes* em lingüiça frescal de frango submetidas à exposição de bacteriocinas. Logo, a avaliação da sobrevivência deste patógeno em lingüiça frescal de frango, pode fornecer dados para a incorporação futura de substâncias do tipo bacteriocina nas normas de preparo, contribuindo para assegurar a qualidade microbiológica do produto e, assim, diminuir o risco de listeriose.

A substância do tipo bacteriocina P34, isolada da bactéria *Bacillus* sp. linhagem P34, foi produzida, purificada e caracterizada anteriormente, demonstrando possuir atividade inibitória para *L. monocytogenes*.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo:

- 1) identificar a presença de bactérias ácido-láticas em lingüiça frescal de frango;
- 2) avaliar a capacidade de sinergismo entre as bactérias ácido-láticas presentes e a bacteriocina P34 na conservação do produto lingüiça frescal de frango frente à bactéria *L. monocytogenes* ATCC 7644;
- 3) avaliar a sobrevivência e persistência de *L. monocytogenes* inoculada artificialmente em lingüiça frescal de frango frente a bacteriocina P34 parcialmente purificada durante estocagem sob temperatura de refrigeração;
- 4) avaliar o efeito da bacteriocina P34 parcialmente purificada incorporada em envoltório natural comestível e artificialmente contaminado com *L. monocytogenes* ATCC 7644 sob diferentes tratamentos;
- 5) avaliar os efeitos da aplicação da bacteriocina P34 e da nisina em lingüiça frescal de frango artificialmente contaminada com *L. monocytogenes* ATCC 7644.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Listeriose

#### 2.1.1 Definição

É uma doença causada pela bactéria *Listeria monocytogenes*, sendo relatada em humanos pela primeira vez em 1929 e foi associada com doença perinatal em 1933 (JAY, 1996).

É uma doença zootóxica grave e infecciosa que pode levar ao aborto, problemas neurológicos e disfunções gastro-intestinais cuja bactéria causadora possui habilidade de se desenvolver em temperaturas baixas, em torno de 3°C, permite sua multiplicação em alimentos refrigerados (VARGAS, 1996).

#### 2.1.2 Etiologia

O gênero *Listeria sp.* contém seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi*, como evidenciado pelos valores de homologia de DNA, seqüência 16S rRNA e propriedades quimiotaxonômicas. (DONNELLY, 2001; McLAUCHLIN, 1997; ROCOURT, 1999; RYSER; DONNELLY, 2001).

O agente etiológico da maioria dos casos de listeriose em humanos é *L. monocytogenes*, um bastonete Gram-positivo, pequeno, curto, de 0,4-0,5 µm de diâmetro e 0,5-2 µm de comprimento, com extremidades arredondadas, que podem apresentar forma cocóide ou filamentosa, em culturas com 2-3 dias (DONNELLY, 1994; FARBER; PETERKIN, 1991; LOVETT; TWEDT, 1988; PHAN-THANH; MAHOUI; ALIGÉ, 2000), podendo ser observados isolados ou em cadeias curtas (ROCOURT, 1999; RYSER; DONNELLY, 2001). Esta bactéria multiplica-se em aerobiose ou anaerobiose e prefere ambientes microaerofílicos (ROCOURT, 1999). Possui rápida multiplicação na maioria dos meios bacteriológicos, crescendo bem em caldo infusão cérebro coração (BHI). Requer biotina, riboflavina, tiamina e aminoácidos como cisteína, glutamina, isoleucina e valina (JAY, 1996; ROCOURT, 1999). As colônias, quando visualizadas a luz transmitida, em direção oblíqua, apresentam brilho azul-esverdeado (FARBER; PETERKIN, 1991).

*L. monocytogenes* é um patógeno psicrotrófico que se multiplica geralmente em temperaturas que variam de -0,4 °C a 50 °C, com multiplicação ótima entre 30 °C e 37 °C (FARBER; PETERKIN, 1991; RYSER; DONELLY, 2001). Possui flagelos peritríquios, os quais dão ao microrganismo característica de motilidade em tombamento, e este comportamento ocorre somente em faixas restritas de temperatura (20°C a 25°C) (FARBER; PETERKIN, 1991; HOLT *et al.*, 1994; ROCOURT, 1999). Pode tolerar concentrações de 10% a 30% de cloreto de sódio e crescer a uma atividade de água de 0,90 (RYSER, 1999), dependendo de fatores que influenciam a multiplicação, como pH e temperatura (LOVETT; TWEDT, 1988). Estudos com *L. monocytogenes* demonstram que o patógeno multiplica-se em valores de pH que variam de 4,4 a 9,6, com pH ótimo de crescimento de 7,0 (RYSER; DONELLY, 2001; SCHUCHAT; SWAMINATHAN; BROOME *et al.* 1991). O patógeno apresenta reação catalase positiva e oxidase negativa; expressa β-hemolisina, produzindo uma zona de clareamento em ágar sangue (BENEDICT, 1990; FARBER; PETERKIN, 1991; HOLT *et al.*, 1994); produz ácido por fermentação de glicose, frutose, manose, galactose, celobiose, maltose, melezitose, trealose e ramnose, sem formação de gás; hidrolisa esculina, salicina, amigdalina e hipurato de sódio; apresenta teste vermelho de metila positivo; produz amônia a partir da arginina; reage negativamente para produção de sulfeto de hidrogênio, indol e nitrato redutase; liquefaz gelatina; hidrólisa amido e uréia; reduz telurito e é parcialmente inibido por 0,02% de azida e cianida (BENEDICT, 1990; JAY, 1996; RYSER; DONELLY, 2001).

Apesar de as espécies de *Listeria* serem fenotipicamente similares, elas podem ser diferenciadas pela produção de hemolisina, incluindo teste CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen) e análise de patogenicidade em camundongos (HOLT *et al.*; 1994; McKELLAR, 1994; ROCOURT, 1988; SEELINGER; JONES, 1986; SCHUCHAT; SWAMINATHAN; BROOME, 1991), e pela produção de ácido a partir de D-xilose, L-ramnose e manitol. A atividade hemolítica é a característica mais importante na identificação de *L. monocytogenes* (HOLT *et al.*; 1994; RYSER; DONELLY, 2001).

### **2.1.3 Epidemiologia e Patogenia**

A bactéria *L. monocytogenes* encontra-se amplamente difundida em plantas, solo e água, sendo também encontrada em silagens, esgotos, resíduos de abatedouros, em leite de vacas saudáveis ou com mastite, e em fezes humanas e de animais (COLBURN *et al.*, 1990; DONALD; FENLON; SEDDON, 1995; FENLON, 1985; FENLON; WILSON; DONACHIE, 1996; WEIS; SEELIGER, 1975). Tem sido isolada de bovinos, ovinos, caprinos, suínos e aves (WEHR, 1987; FARBER; PETERKIN, 1991; FENLON, 1999). Entretanto, o habitat primário para *L. monocytogenes* parece ser solo e vegetação, onde a bactéria possui uma existência saprofítica com o solo servindo de reservatório para posteriores infecções transmitidas para animais e humanos (RYSER; DONNELLY, 2001). Vegetação ou silagem deterioradas foram associadas como fonte de infecção em vários casos de listeriose em animais de fazenda, por favorecerem o desenvolvimento de *L. monocytogenes* e servirem de suporte para o patógeno se espalhar através da cadeia alimentar (FARBER; PETERKIN, 1991). A resistência do patógeno à diversidade do meio, aliada à capacidade de colonizar, multiplicar e sobreviver em equipamentos de plantas de processamento, fazem com que *L. monocytogenes* desperte o interesse das indústrias de alimentos (FENLON, 1999). Em animais, a taxa de portadores assintomáticos é de 1% a 5%, porém estudos utilizando diferentes metodologias para isolamento de *Listeria* spp. têm mostrado essas taxas mais elevadas (FARBER; PETERKIN, 1991). Em humanos, a presença de *Listeria* spp. no excremento fecal varia de 0% a 77% (RYSER, 1999), com aproximadamente 5% a 10% da população geral sendo portadora assintomática de *L. monocytogenes* (FARBER; PETERKIN, 1991). Dados epidemiológicos do Centers for Disease Control and Prevention (CDCP) indicam a ocorrência de aproximadamente 2.500 casos de listeriose e 500 mortes anualmente nos Estados Unidos com uma incidência da doença estimada em 4,4 casos por milhão de habitantes (TAPPERO *et al.*, 1995).

A listeriose em humanos é frequentemente vista como uma doença invasiva em grupo de risco bem definido, ocorrendo principalmente em mulheres grávidas, pessoas idosas, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida, alcoolismo e cirrose, portadores de diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e renais, carcinoma e outras doenças que afetam o sistema imunológico (FARBER; PETERKIN, 1991; RYSER; DONNELLY, 2001). O intestino humano apresenta-se como ponto de entrada de *L. monocytogenes* (LOVETT, 1989). A dose de infecção é baixa, com período de incubação variável, que pode ir de dias a semanas (SLUTSKER;

SCHUCHAT, 1999), exibindo uma taxa de mortalidade de aproximadamente 30% para indivíduos do grupo de risco. Essa taxa pode chegar a 70% quando a doença se manifesta através de meningite (GELLIN; BROME, 1989; FARBER; PETERKIN, 1991; LOVETT; TWEDT, 1988).

Bacteremia é a manifestação mais comum da doença em adultos. Os pacientes apresentam geralmente sintomas como febre, mal-estar, fadiga e dor abdominal, enquanto, em indivíduos que apresentam o comprometimento do sistema nervoso central, a doença se manifesta com febre, fadiga, estado mental alterado, meningite, encefalite e abscessos. Em mulheres grávidas, a doença se manifesta com sintomas semelhantes aos da gripe, com febre, dores de cabeça e mialgia, podendo haver a contaminação do feto, dependendo do estágio da gestação. A infecção intra-uterina pode resultar em nascimento prematuro, aborto espontâneo, nascimento de natimorto ou septicemia neonatal. Em recém-nascidos, listeriose provoca problemas cardíacos e respiratórios, convulsões, vômito, granulomas e nódulos em diferentes órgãos. Também pode causar artrites, osteomielites, septicemia com faringites e mononucleoses, abscessos na espinha e cérebro, e peritonites (RYSER; DONNELLY, 2001; RYSER; MARTH, 1991; LOVETT, 1989; FARBER; PETERKIN, 1991; SLUTSKER; SCHUCHAT, 1999).

Apesar da listeriose não ser uma doença recente, só há relativamente pouco tempo foi associada ao consumo de alimentos contaminados com *L. monocytogenes*. Efetivamente, a origem alimentar da listeriose só foi comprovada em 1981 (GUERRA; BERNARDO, 2004) sugerindo que a contaminação de alimentos pode ser a principal fonte do microrganismo (FARBER; PETERKIN, 1991).

Em 1991, um surto de listeriose em humanos ocorreu na Inglaterra após o consumo de patê (McLAUHLIN *et al.*, 1991). Em 1992, seis casos (um fatal) da doença ocorreram na Noruega, seguidos ao consumo de carnes fatiadas prontas para consumo, contaminadas com *L. monocytogenes* sorotipo 1/2 (BREDHOLT; NESBAKKEN; HOLCK, 1999). Na França, 297 casos e 63 óbitos ocorreram devido ao consumo de geléia de língua de porco contaminada com *L. monocytogenes* sorotipo 4b. Testes moleculares mostraram que linhagens isoladas do produto apresentavam o mesmo perfil genético das cepas isoladas dos pacientes (ROCOURT; COSSART, 1997). Consumo de patê também foi associado a casos epidêmicos de listeriose no Reino Unido e na República da Irlanda entre 1985 e 1989. De agosto 1998 a fevereiro de 1999, ocorreu o segundo maior surto de listeriose na América do Norte, provocado

pelo consumo de salsichas. Foram relatados 101 casos em 22 estados, com 12 mortes e 3 abortos (CDCP, 1999). Em 2000, um surto de listeriose resultou em 29 casos da doença, 4 mortes e 3 abortos, em 10 estados norte-americanos, tendo como veículo de contaminação carne de peru (CDCP, 2000).

#### **2.1.4 Presença da bactéria nos alimentos cárneos**

No Brasil, de acordo com o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, anexo da Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, não existe critério estabelecido para o patógeno em carnes, não havendo exigência de análise para detecção de *L. monocytogenes* em carnes ou produtos cárneos prontos para consumo (BRASIL, 2001).

Em 1986 e 1987, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças Norte-Americano (CDCP) conduziu um estudo para verificar que tipo de alimento estava associado a 82 casos de listeriose, estimando-se que 20% dos casos esporádicos da doença nos Estados Unidos estavam associados a salsichas consumidas sem serem reaquecidas antes do consumo e ao consumo de frango mal cozido (TOMPkin *et al.*, 1992).

Apesar de a presença de *L. monocytogenes* ser associada a uma ampla variedade de alimentos (FARBER; PETERKIN, 1991), os últimos surtos e casos esporádicos de listeriose em humanos têm sido associados a produtos cárneos prontos para consumo (CDCP, 1999; CDCP, 2000). Vários estudos realizados com diversos tipos de carnes e produtos cárneos mostraram que a incidência de contaminação pode variar significativamente (de menos de 1% a 90%) (HUDSON *et al.*, 1992; JAY, 1996; JOHNSON; DOYLE; CASSENS, 1990). A variação deve-se a fatores como o método de detecção utilizado, o tamanho da amostra, o número de colônias individuais isoladas tomadas para confirmação de presença de colônias hemolíticas e a fonte da qual a amostra foi obtida (FARBER; PETERKIN, 1991; JOHNSON; DOYLE; CASSENS, 1990).

A incidência de *L. monocytogenes* no Brasil em carne e produtos cárneos também tem sido estudada. Destro, Serrano e Kabury (1991) determinaram a incidência de *Listeria* spp. em diferentes produtos cárneos, detectando *L. monocytogenes* em 75,4% das amostras analisadas, observou-se que 65% das amostras de carne bovina moída, 82,4% das amostras de salsichas e 80% das amostras de lingüiça

de carne suína estavam contaminadas com o patógeno. Assis *et al.* (2000) investigaram a incidência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em carne eqüina para consumo humano. Das 121 amostras testadas, 18,2% foram positivas para *Listeria* spp. e destas, 7,4% foram positivas para *L. monocytogenes*. Bersot *et al.* (2001) avaliaram a presença de *L. monocytogenes* em 30 amostras de mortadelas adquiridas no mercado a varejo e observaram uma alta incidência do patógeno nesse tipo de produto. Das 30 amostras analisadas, 36,7% (11 de 30) foram positivas para *Listeria* spp., e 26,7% (8 de 11) foram positivas para *L. monocytogenes*. Na Espanha, a incidência foi pesquisada por Campillo, Dominguez-Fernandez e Zumalacarregui-Rodríguez (1999). O patógeno foi isolado em 11,4% das 175 amostras analisadas. Os níveis mais altos de contaminação inicial (24%) foram observados para as carnes moídas suína e bovina, com incidências de 16% em hambúrguer de carne bovina e 10% em carne de frango. No Canadá, Farber *et al.* (1989) pesquisaram a presença de *L. monocytogenes* em produtos cárneos onde constataram 56,3% (9 de 16) das amostras de coxas de frango positivas. Na Austrália, Grau e Vanderlinde (1992) verificaram a incidência de *Listeria* spp. em produtos cárneos prontos para consumo comercializados no varejo durante um período de 12 meses. *Listeria* spp. foi detectada em 93 das 175 amostras analisadas (53%), e *L. monocytogenes* foi detectada em 80,6% (75 de 93) das amostras positivas. Genigeorgis, Oanca e Dutulescu (1990) avaliaram a incidência de *Listeria* spp. em asas e coxas frescas de peru comercializadas no varejo, e *L. monocytogenes* foi detectada em 20% das asas e em 13,3% das coxas.

A capacidade de alguns produtos cárneos permitirem a multiplicação ou sobrevivência de *L. monocytogenes* também vem sendo pesquisada (BUNCIC; PAUNOVIC; RADISIC, 1991; GRAU; VANDERLINDE, 1992; McKELLAR; MOIR; KALAB, 1994; VELANI; GILBERT, 1990; YOUSEF *et al.*, 1991). Várias explicações têm sido atribuídas à capacidade desta bactéria sobreviver a longos períodos de estocagem sob temperaturas de refrigeração em carnes e produtos cárneos sem apresentar um aumento da população viável, como, por exemplo, o efeito competitivo da microbiota natural (JOHNSON *et al.*, 1988; SHELEF, 1989), o efeito da atmosfera modificada, e ingredientes, como a presença de ácidos orgânicos, NaCl, pH, presença de bactérias lácticas e/ou bacteriocinas (BUCHANAN; PHILLIPS, 1990; CHEN; SHELEF, 1992; DE MARTINIS *et al.*, 1997; LE MARC *et al.*, 2002; NERBRINK *et al.*, 1999; THAYER; BOYD, 1999; THAYER; BOYD, 2000; TIENUNGOON *et al.*, 2000).

### **2.1.5 Controle de *Listeria monocytogenes* em alimentos**

Os fatores utilizados no controle de *L. monocytogenes* em determinado alimento dependem de sua sobrevivência e multiplicação nesse produto específico. Esta bactéria pode tolerar uma ampla faixa de pH, temperaturas, concentrações de sal e atividade de água que podem ser indesejáveis para diversas outras bactérias. Devido a essa característica, tentativas de controle do patógeno têm sido feitas visando prevenir a presença de *L. monocytogenes* nas plantas de processamento, de forma a evitar a contaminação do produto final (LOVETT, 1989). Em alimentos prontos para consumo, a refrigeração muitas vezes atua como o principal meio de controle de microrganismos, sendo algumas vezes o único meio utilizado nesse tipo de produto. Refrigeração ou embalagem à vácuo podem não ser barreiras suficientes contra a multiplicação de patógenos em produtos cárneos (QVIST; SEHESTED; ZEUTHEN, 1994). Em caso de temperatura abusiva durante o período de estocagem, alguns microrganismos patogênicos psicrotróficos, como *L. monocytogenes*, podem multiplicar-se com pouca ou nenhuma mudança nas características sensoriais do produto (HAO; BRACKETT; DOYLE, 1998). Sendo assim, a aplicação de barreiras físicas (irradiação, ultra-alta pressão, calor), químicas (ácidos orgânicos e sais, compostos fenólicos) ou biológicas (bactérias lácticas e bacteriocinas) para o controle de *L. monocytogenes* deve ser considerada como sistema alternativo na conservação de produtos cárneos prontos para consumo (CUTTER, 2000; JUNCHER *et al.*, 2000; KANG; FUNG, 1999; KIM; MARSHALL; WEI, 1995; NIKU-PAAVOLA *et al.*, 1999; QVIST; SEHESTED; ZEUTHEN, 1994; SAMELIS *et al.*, 2002; SEMAN *et al.*, 2002; SOFOS *et al.*, 1998).

## **2.2 Bactérias Lácticas**

### **2.2.1 Generalidades**

É notório que alimentos, industrializados ou não, possam conter uma ampla variedade e quantidade de microrganismos, que interferiram em sua vida útil assim como, possam ser veiculadores de doenças. Existem inúmeros recursos para eliminar esses microrganismos ou controlar o seu desenvolvimento nos alimentos,

incluindo tratamento térmico, adição de conservadores químicos, uso de baixa temperatura (refrigeração e congelamento) durante o armazenamento, entre outros. No entanto, muitos consumidores consideram que esses procedimentos interferem na qualidade nutricional dos alimentos, além de acreditar que os conservadores químicos são perigosos para a saúde, até mais perigosos que os próprios microrganismos que esses produtos pretendem controlar (MURIANA, 1996).

Com isso, aumenta também a preocupação dos fabricantes de alimentos em produzir alimentos que não necessitem desses procedimentos para que sejam saudáveis e para que atendam os parâmetros de qualidade e segurança exigidos pelos consumidores e fabricantes. Uma dessas estratégias é explorar a capacidade dos microrganismos inócuos, naturalmente presentes nos alimentos ou artificialmente adicionados, de inibir microrganismos que são indesejáveis, quer sejam deteriorantes, quer sejam prejudiciais a saúde. Esse processo denomina-se **bioconservação**, e vem sendo cada vez mais estudado devido ao seu enorme potencial de aplicação nos mais variados tipos de alimentos. Os microrganismos mais adequados para uso como bioconservadores são as bactérias lácticas, devido a suas características antagonísticas e sua grande tradição de uso como bactérias iniciadoras em alimentos fermentados (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

### **2.2.2 Definição e características**

As bactérias lácticas (BAL) compreendem um grupo amplo de microrganismos, mas que apresentam diversas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. São microrganismos Gram-positivos, não formadores de esporos, anaeróbios, aerotolerantes, fastidiosos, ácido tolerantes, com metabolismo estritamente fermentativo, apresentando o ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002). São bactérias acidófilas sendo que o ácido láctico é produzido rapidamente e em grande quantidade, reduzindo o pH e impedindo o desenvolvimento de organismos competidores (CHAGAS, 1994).

Nutricionalmente as bactérias lácticas são muito exigentes. Possuem habilidade biossintética limitada e necessitam de aminoácidos, vitaminas, purinas e pirimidinas. Necessitam para o crescimento meios ricos em peptonas e hidrolisados protéicos, extrato de levedura rico em proteínas, vitaminas e nucleotídeos, e carboidratos. Apresentam colônias pequenas e sem produção de pigmentos. Algumas

bactérias ácido-láticas crescendo em meio sólido com sacarose conseguem produzir grandes quantidades de polissacarídeos e, em consequência, produzem colônias grandes, translúcidas (compostas principalmente dos polissacarídeos excretados). Quando microrganismos crescem na presença de O<sub>2</sub>, substâncias oxidantes tóxicas ao metabolismo são produzidas: peróxidos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superóxidos (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), radical hidroxila (OH). São poucos os ambientes naturais, sendo que o principal habitat dos cocos e bastonetes homofermentativos é o corpo dos animais de sangue quente. Em animais, estão associados à flora normal da pele e mucosas como a orofaringe, o trato gastrointestinal e o trato genito-urinário. Nos vegetais vivem em associação com estes e crescem às custas de nutrientes eliminados a partir da morte do vegetal. E quando presentes no leite, tiveram acesso através da pele e mucosas do animal (CHAGAS, 1994).

As bactérias lácticas possuem uma grande importância na indústria de alimentos, onde os principais gêneros são *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Pediococcus* (TRÍBOLI, 1997), porém dois aspectos devem ser considerados quando se utiliza cultura iniciadora na indústria de carnes: a fermentação e a antibiose. No primeiro caso, a cultura iniciadora adicionada age sobre o substrato, resultando em benefícios à carne. No caso da antibiose, a cultura iniciadora deve inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis que causam danos ao produto ou à saúde humana (TERRA, 1993).

## 2.3 Bacteriocinas

### 2.3.1 Definição

Bacteriocinas são peptídeos biologicamente ativos, com atividade antimicrobiana contra bactérias, usualmente, estreitamente relacionadas à bactéria produtora. São caracterizadas como substâncias de espectro de atividade restrito, possuidoras de uma fração protéica ativa, com atividade bactericida, com mecanismo de ação dando-se através de ligação a receptores específicos na parede celular das células sensíveis, com informação genética plasmidial e que sua produção fosse por biossíntese letal (TAGG, DAJANI, WANNAMAKER, 1976).

Entretanto existe uma diversidade de outras substâncias com atividade antimicrobiana que não, necessariamente, apresentam todas estas

características. O termo substância do tipo-bacteriocina (*bacteriocin-like*) engloba os compostos antimicrobianos de natureza protéica que ainda não estão completamente definidos ou não cumprem com todas as características originalmente associadas às bacteriocinas. Estas substâncias, geralmente, possuem um espectro de ação maior, atuando contra uma variedade de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e contra alguns fungos (DE VUYST, VANDAMME, 1994).

Substâncias com atividade antimicrobiana são encontradas sendo produzidas por uma diversidade de microrganismos. Acredita-se que 99% de todas as bactérias possam produzir pelo menos uma bacteriocina, campo este que merece mais pesquisas para a descoberta de substâncias com potencial de aplicação como antimicrobianos (KLAENHAMMER, 1988).

Algumas bacteriocinas já possuem seu potencial de ação bem determinado como antimicrobiano, assim como sua possível aplicação como conservante de alimentos. As bacteriocinas com maior potencial aplicação prática em alimentos são as produzidas por bactérias lácticas, as quais são consideradas GRAS (generally regarded as safe) pelo Food and Drug Administration (FDA) (MONTVILLE; WINKWOSKI, 1997, SULLIVAN; ROSS, R.P.; HILL, 2002).

### **2.3.2 Classificação das bacteriocinas**

A descoberta de diferentes bacteriocinas revelou diversidade de estruturas químicas e características permitindo o agrupamento em diferentes classes (KLAENHAMMER, 1993).

Altena *et al.* (2000), descrevem a Classe I de bacteriocinas que contém os lantibióticos como peptídeos pequenos (<5kDa), que possuem de 19 a 50 aminoácidos. Esta classe está subdividida em Classe Ia e Classe Ib. A Classe Ia, que inclui a nisina, consiste de peptídeos hidrofóbicos e catiônicos que formam poros na membrana da célula alvo e possuem uma estrutura flexível, quando comparados com uma estrutura mais rígida dos peptídeos da Classe Ib, que inclui peptídeos globulares com carga negativa ou que não possuem carga.

Segundo Nes *et al.* (1996), a Classe II contém peptídeos não modificados e estáveis ao calor e que também podem ser subdivididos. A Classe IIa inclui os peptídeos como a pediocina, ativos contra *Listeria*. Já as bacteriocinas compostas de 2 peptídeos diferentes pertencem à Classe IIb, necessitando de ambos

para ser totalmente ativa. A Classe IIc foi proposta para separar as bacteriocinas secretadas pelo sistema *sec*-dependente.

Na Classe III temos as bacteriocinas maiores (30 kDa) e lábeis ao calor, mas há poucas informações disponíveis; um exemplo é a helveticina J (NES *et al.*, 1996).

Já na Classe IV, estão agrupadas as bacteriocinas que formam complexos com outras macromoléculas (como lipídeos e carboidratos), não sendo uma classe muito bem estudada em nível bioquímico (CLEVELAND *et al.*, 2001; MCAULIFFE, ROSS, HILL, 2001). A existência desta classe foi considerada, a partir do momento em que foi observado que algumas atividades de bacteriocinas obtidas de sobrenadantes livres de células, foram perdidas, não só por tratamento com proteases, mas com enzimas lipolíticas e glicolíticas. A plantaricina S é um exemplo de bacteriocina pertencente a esta classe (KLAENHAMMER, 1993).

### **2.3.3 Bactérias lácticas como produtoras de bacteriocinas**

As bactérias lácticas podem produzir substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, conferindo aos produtos maturados e frescos, melhor qualidade sanitária (HURST, 1983). Vignollo *et al.* (1993) afirmaram que bacteriocinas ou espécies produtoras de bacteriocinas podem ser usadas como conservantes naturais em alimentos para melhorar a segurança de alguns produtos como derivados do leite e da carne, enquanto que os antibióticos não são permitidos em alimentos.

Bromberg *et al.* (2006) isolaram linhagens de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas de carnes e seus produtos derivados resultando na detecção de *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484, proveniente de frango. Sua bacteriocina correspondente inibiu não apenas uma outra bactéria láctica (*Lactobacillus helveticus*), mas também microrganismos patogênicos (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Enterococcus faecalis*).

De Martinis e Franco (1998) demonstraram que a bactéria *Lactobacillus sake* 2a, atualmente *Lactobacillus sakei*, produtora de bacteriocina e isolada de lingüiça frescal, apresenta atividade anti-*Listeria* em lingüiça frescal artificialmente contaminada.

### 2.3.4 Nisina

A nisina é a única bacteriocina disponível comercialmente para utilização em alimentos. Esta bacteriocina é produzida por algumas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, é atóxica, destruída por enzimas digestivas e não confere sabores e odores desagradáveis aos alimentos.

A nisina foi reconhecida como aditivo alimentar pela Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS) em 1969, sendo permitida para uso em alimentos em diversos países. Na legislação da Comunidade Européia pode ser rotulada como aditivo natural com código E234.

No Brasil, a nisina é aprovada para uso em todos os tipos de queijo no limite máximo de 12,5 mg/kg e nosso país é pioneiro na utilização dessa bacteriocina em produtos cárneos, sendo permitida a sua aplicação na superfície externa de salsichas de diferentes tipos. O produto pode ser aplicado como solução comercial de nisina a 0,02% (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

A aplicação de nisina em carnes é um assunto bastante controverso. Ela foi avaliada por alguns autores, obtendo-se sucesso quando aplicada em superfícies de carnes, a fim de reduzir as contagens de *L. monocytogenes* (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002). Davies *et al.* (1999) relataram que nisina, utilizada nos níveis de 6,25 a 25 mg/g, foi eficiente para controlar bactérias deteriorantes em mortadela tipo Bologna.

Entretanto, a aplicação de nisina em carnes pode ser limitada devido à sua baixa solubilidade nesses produtos, à possibilidade de destruição por enzimas da carne crua e à ineficiência na inibição de vários organismos patogênicos ou deteriorantes de importância em carnes (DE MARTINIS *et al.*, 2002). A efetividade da aplicação de nisina na superfície de salsichas, conforme preconizado pelo Ministério da Agricultura do Brasil, foi avaliada por Castro (2002) que demonstrou que esse procedimento é pouco efetivo no controle de *L. monocytogenes* ou de microrganismos deteriorantes, incluindo psicrotóxicos e bactérias lácticas.

Porém, Kominsky (1997) testou a nisina onde, em soluções de imersão, mostrou-se adequada para inibir os microrganismos *Brochothrix thermosphacta*, *Weissella viridescens*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Listeria monocytogenes*, testados em salsichas comuns e de frango inoculados artificialmente.

## 2.4 Bacteriocina P34

Motta (2006) identificou, purificou e caracterizou um peptídeo antimicrobiano, a partir da seleção de culturas oriundas de 86 isolados do ambiente aquático da Amazônia, o qual apresentou espectro de atividade contra microrganismos patogênicos importantes. A bactéria produtora do composto foi identificada como pertencente ao gênero *Bacillus*, agrupada, segundo a análise filogenética com a espécie *Bacillus infernus*, mas com características fisiológicas e bioquímicas bastante distintas, indicando a possibilidade do isolamento e identificação de uma nova espécie de *Bacillus* (*Bacillus amazonensis*).

O peptídeo antimicrobiano denominado bacteriocina P34 mostra, segundo a espectrometria de massas, tratar-se de um composto com massa molecular de 1498.68 Da e, cujo modo de ação se dá por alterações em nível de membrana celular provocando efeitos bactericida e bacteriolítico em *Listeria monocytogenes*. A bacteriocina P34 causa o rápido decréscimo do número de células viáveis de *L. monocytogenes* em fase exponencial de crescimento. Dependendo de sua concentração no meio de cultura provoca alteração nos constituintes lipídicos da membrana, formação de vesículas no protoplasma celular, poros na membrana e desintegração das células. É termoestável e com atividade em ampla faixa de pH, com atividade máxima produzida na fase estacionária de crescimento bacteriano, embora sendo iniciado na fase exponencial de crescimento, sugerindo tratar-se de metabólito primário de *Bacillus* sp. P34 (MOTTA, 2006).

Segundo Motta (2006), a bacteriocina P34 apresenta espectro inibitório para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas incluindo microrganismos importantes como *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Erwinia carotovora*, *Aeromonas hydrophila*, *Pasteurella haemolytica*, entre outras. Apresenta também atividade antimicrobiana residual de 100% após tratamento térmico de 100°C por 15 minutos, atividade antimicrobiana na faixa de pH 3,0 a 10,0 e atividade residual em torno de 65% ao congelamento a -20°C por 15 dias. Apresenta características aniônicas e é altamente hidrofóbica, sugerindo que a maior parte de seus aminoácidos constituintes são de natureza apolar. Diante disso, a bacteriocina P34 apresenta um espectro de ação relativamente amplo o que permite caracterizá-la como pertencente à Classe Ib, de acordo com a classificação de Klaenhammer (1993).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 *Microorganismos*

Os microrganismos *Bacillus* sp. linhagem P34, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria monocytogenes* 4C, *Listeria monocytogenes* 7D78/03, *Listeria innocua* ATCC 33090 4R, *Listeria innocua* 1572, *Listeria ivanovii* 5 NCTC 11007, *Listeria seeligeri* AC 82/4, *Listeria welchimeri* AC 73/2 e *Listeria* spp. foram obtidos da bacterioteca do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS - RS).

As linhagens de bactérias lácticas foram isoladas de lingüiça frescal de frango pela técnica de pesquisa de bactérias lácticas em ágar MRS (Man-Rogosa-Sharpe).

##### 3.1.2 *Reagentes e Meios*

Foram utilizados no decorrer de todo o experimento os seguintes reagentes e meios: Trypticase Soy Agar (TSA; Mast Group Merseyside, UK); Brain Heart Infusion (BHI; Oxoid Basingstoke, UK); Trypticase Soy Broth (TSB; Acumedia, Baltimore, USA); Man-Rogosa-Sharpe (MRS; Vetec, BR); Agar (Vetec, São Paulo, BR); Peptone Water (Merck; Darmstadt, Germany); Oxford Listeria agar base (Acumedia; Baltimore, USA); Oxford Listeria selective supplement (Merck; Darmstadt, Germany); Sephadex G-100; Solução salina 0,85% (NaCl; Quimex, BR); água destilada pH 7,0; NaOH 5% (Nuclear; São Paulo, BR); solução tampão fosfato 10 mM pH 7,0 e pH 6,0 (fosfato dissódico hidratado e fosfato monossódico hidratado; Merck, Darmstadt, Germany); Tween 80 (Nuclear; São Paulo, BR) e Nisaplin (Danisco).

##### 3.1.3 *Produto a ser testado*

O produto a ser testado foi lingüiça frescal de frango (salsichão de frango) obtida em sua totalidade de amostras no Estabelecimento Matadouro-Frigorífico e Fábrica de Embutidos BOAVE – Ltda sob CISPOA nº 787.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 *Manutenção dos microrganismos***

O microrganismo produtor da bacteriocina, *Bacillus* sp., e o microrganismo indicador da sensibilidade, *L. monocytogenes*, foram semeados por esgotamento em placas de ágar TSB e ágar BHI para confirmação da pureza das linhagens, e mantidas sob refrigeração. As bactérias lácticas isoladas do produto foram mantidas em ágar MRS. As linhagens foram repicadas a cada 15 dias.

### **3.2.2 *Obtenção da bacteriocina P34 parcialmente purificada***

#### **3.2.2.1 Preparação do pré-inóculo**

As colônias do microrganismo produtor, estocadas em ágar TSB, foram coletadas por raspagem de placas e transferidas para frascos com 20 ml de caldo TSB. A cultura foi incubada a 37°C por 24 horas; em equipamento incubador com agitação (180 rpm).

#### **3.2.2.2 Produção da substância antimicrobiana**

O crescimento do microrganismo produtor foi acompanhado com cultivos em frascos erlenmeyer de 500 ml, contendo 200 ml de caldo TSB, pH 7,0. A incubação foi realizada a 30°C por 24 horas, em equipamento incubador com agitação (180 rpm). Para a obtenção da substância antimicrobiana do cultivo em caldo, foi realizada uma centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos a 12°C, para separar as células bacterianas do sobrenadante bruto do meio de cultivo. Após, foi realizada a primeira etapa de purificação, obtendo-se a substância parcialmente purificada.

### 3.2.2.3 Purificação parcial da bacteriocina P34

O sobrenadante bruto foi submetido a precipitação com sulfato de amônio à 20 % de saturação, a 10°C em agitação, ressuspendido com tampão fosfato 10 mM pH 7,0 e filtrado em membrana 0,22 µm (Millipore, Bedford, USA). Após, foi eluído com a mesma solução tampão em coluna de gel-filtração Sephadex G-100 e frações de 1 ml foram coletadas para realização do teste de atividade antimicrobiana. As frações com atividade foram reunidas e estocadas a 4°C para seu uso posterior nos experimentos realizados.

### 3.2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana da bacteriocina P34 parcialmente purificada em diferentes espécies de *Listeria spp.*

Para avaliação da atividade antimicrobiana foi empregado o Método de Difusão em Ágar com Discos (KIMURA *et al.*, 1998). A substância antimicrobiana foi testada de modo a verificar sua capacidade de inibir as culturas indicadoras (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria monocytogenes* 4C, *Listeria monocytogenes* 7D78/03, *Listeria innocua* ATCC 33090 4R, *Listeria innocua* 1572, *Listeria ivanovii* 5 NCTC 11007, *Listeria seeligeri* AC 82/4, *Listeria welchimeri* AC 73/2 e *Listeria spp.*). Para o preparo das culturas indicadoras, foi feita uma suspensão de cada cultura em tubo de ensaio com 4,5 ml de solução de NaCl 0,85%. Foi feita a padronização da suspensão obedecendo a densidade ótica de aproximadamente 0,15, que correspondeu a 0,5 na Escala de McFarland, tendo-se aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/ml (unidades formadoras de colônias por mililitro) de cada cultura indicadora. A suspensão foi espalhada uniformemente sobre o ágar com swab estéril e após, foi realizada a colocação dos discos de celulose esterilizados sobre a superfície da placa contendo meio ágar TSB. As preparações contendo a substância antimicrobiana foram aplicadas sobre os discos em alíquotas de 20 µl. As placas foram incubadas nas temperaturas ótimas das culturas indicadoras. As leituras para verificação da formação de halos de inibição foram realizadas em 24 horas de incubação; sendo a presença de halos indicativa da presença de atividade antimicrobiana. O título da atividade da bacteriocina foi determinado pelo método da diluição seriada. A atividade foi definida como sendo a recíproca da última diluição que apresentou uma zona de inibição, e foi expressa em unidades arbitrárias por mililitro (UA/ml), de acordo com Mayr-Harting, Hedjes e Berkeley (1972).

### **3.2.4 Avaliação da atividade da bacteriocina P34 parcialmente purificada em diferentes tempos de inoculação frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644**

A bacteriocina P34 parcialmente purificada foi aplicada em alíquotas de 20 µl em placas com ágar TSB em dois momentos de crescimento microbiano de *L. monocytogenes*, no tempo zero, ou seja, logo após a semeadura na placa do microrganismo indicador e 24 horas mais tarde, com o patógeno já crescido. Ambos grupos experimentais foram incubados à temperatura de refrigeração por 8 dias e testados com 3 concentrações diferentes, 6400 UA/ml, 3200 UA/ml e 1600 UA/ml. O experimento foi realizado em triplicata e a suspensão com o microrganismo indicador foi padronizada obedecendo a densidade ótica de aproximadamente 0,15 a 600 nanômetros, que correspondeu a 0,5 na Escala de McFarland.

### **3.2.5 Análise microbiológica da lingüiça frescal de frango**

Foi realizada análise microbiológica do produto a ser testado conforme os padrões legais vigentes segundo Resolução RDC nº 12 de Janeiro de 2001 do Ministério da Saúde.

### **3.2.6 Pesquisa e isolamento de bactérias lácticas do produto**

Conforme normas preconizadas, a unidade analítica foi coletada assepticamente e transferida para erlenmeyer previamente esterilizado e tarado, onde foi homogeneizada. O preparo da primeira diluição constou da adição de 225 ml de água peptonada 0,1% à 25 g da amostra cárnea. Após transferiu-se para equipamento stomacker durante 2 minutos com o diluente pré-resfriado em banho de gelo. O intervalo entre a homogeneização e o prosseguimento da análise não ultrapassou 3 minutos. Foram realizadas mais 3 diluições seriadas da amostra homogeneizada até a diluição  $10^{-4}$ .

Para isolamento das bactérias lácticas, realizou-se a inoculação em profundidade de 1 ml de cada diluição em placas de Petry estéreis adicionando em seguida o ágar MRS, sendo estas incubadas invertidas após a completa solidificação do ágar a 30°C / 48-72 horas em atmosfera microaerófila. Após 72 horas, as colônias foram selecionadas e isoladas também em placas com ágar MRS.

### **3.2.7 Teste de antagonismo das bactérias lácticas frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644**

As bactérias lácticas já isoladas foram semeadas com agulha em forma de picada em ágar MRS, colocando-se 3 a 4 pontos por placa e crescidas por 24 horas. Paralelamente, foi realizado pré-inóculo de *L. monocytogenes* ATCC 7644 em caldo BHI em 5 tubos contendo 10 ml de caldo BHI e incubados a 37°C por 24 horas. Em outros tubos foram preparados 50 ml de ágar BHI semi-sólido (BHI adicionado de 0,6 % de agar) para onde, foram transferidos 200 µl ou 100 µl dos pré-inóculos. Foi vertido o conteúdo dos tubos de ágar BHI semi-sólido contendo o inóculo sobre as placas com as bactérias lácticas sendo o local da inoculação de cada ponto identificado. As placas foram incubadas a 30°C / 24 hs. O experimento foi realizado em triplicata e os inóculos de BHI com o microrganismo indicador foram padronizados obedecendo a densidade ótica de aproximadamente 0,15, que correspondeu a 0,5 na Escala de McFarland.

### **3.2.8 Produção de sobrenadantes brutos de bactérias lácticas e teste de sinergismo com a bacteriocina P34 parcialmente purificada frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644**

Foram preparados pré-inóculos de cada uma das bactérias lácticas isoladas coletando-se uma colônia da placa e inoculando-a em 20 ml de caldo MRS e incubando a 30°C / 24 horas, em equipamento incubador com agitação (180 rpm). Destes, o inóculo fez-se com a adição de 1 ml do pré-inóculo em 99 ml de caldo TSB, sendo também colocado a seguir em equipamento incubador com agitação (180 rpm) a 30°C / 48 hs. Para a obtenção da substância antimicrobiana do cultivo em caldo, foi realizada uma centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos a 12°C, para separar as células bacterianas do sobrenadante do meio de cultivo, que então foi retirado e medido seu pH. Cerca de metade do volume do sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de sódio 5% até obtenção de pH 7,0 e na outra metade do volume foi mantido o valor original do pH. O microrganismo indicador, *L. monocytogenes* ATCC 7644, foi ressuscitado em solução salina 0,85% padronizada em 0,15 por densidade ótica em espectrofotômetro sendo semeada com swabs estéreis em placas de ágar BHI. Discos de celulose estéreis foram colocados nestas placas sendo inoculados alíquotas de 20 µl do sobrenadante

bruto com pH neutralizado e não-neutralizado. As placas foram divididas em 5 partes, sendo: sobrenadante bruto não-neutralizado (SNN), sobrenadante bruto neutralizado (SN), bacteriocina P34, sobrenadante bruto não-neutralizado com bacteriocina P34 (SNN+P34), e sobrenadante bruto neutralizado com bacteriocina P34 (SN+P34), com seus volumes equalizados.

### **3.2.9 Inoculação de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e bacteriocina P34 parcialmente purificada em lingüiça fresca de frango**

O microrganismo indicador, *L. monocytogenes* ATCC 7644, foi ressuscitado em solução salina 0,85% padronizada em 0,15 por densidade óptica em espectrofotômetro. Diluições seriadas foram realizadas em água peptonada 0,1% obtendo-se concentração de células de aproximadamente  $10^2$  UFC/ g.

As embalagens foram abertas após desinfecção dos pontos de abertura destas com etanol a 70% conforme os Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes, preconizado pelo Ministério da Agricultura. As amostras constando de 25 g foram retiradas e pesadas em balança analítica sendo depositadas separadamente em placas de Petry estéreis. Assim, três grupos de tratamento foram arranjados da seguinte forma: grupo 1, que constituiu-se da amostra cárnea adicionada de 2 ml de solução tampão fosfato 10 mM pH 7,0 sendo conservada sob refrigeração a 5°C por 10 dias; grupo 2, que constituiu-se da amostra cárnea adicionada de 1 ml da suspensão de células da bactéria *L. monocytogenes* ATCC 7644 e 1 ml da bacteriocina P34 parcialmente purificada; e o grupo 3 que constituiu-se da amostra cárnea adicionada de 1 ml da suspensão de células do microrganismo indicador e 1 ml de solução tampão fosfato 10 mM pH 7,0. Foram tomadas amostras nos dias zero, três, sete e dez a partir da data de fabricação das lingüiças nos 3 grupos, todos do mesmo lote de fabricação. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Foi realizado, adicionalmente, com os mesmos princípios, o experimento incluindo a nisina que constou de cinco grupos distribuídos da seguinte forma: grupo controle, grupo com o microrganismo indicador apenas, grupo com bacteriocina P34 parcialmente purificada, grupo com nisina e grupo com 50% da dose aplicada de nisina e bacteriocina P34 parcialmente purificada. As coletas para

recuperação da *L. monocytogenes* e contagem de UFC/g foram realizadas nos dias zero e dez. O experimento foi mantido sob refrigeração a 5°C.

### **3.2.10 Recuperação de *L. monocytogenes* em lingüiça frescal de frango**

Foram pesadas 10 g das amostras das placas e colocadas em sacos plásticos estéreis adicionados de 90 ml de água peptonada 0,1%. Estes foram agitados em equipamento stomacker por 1 minuto e deixados em repouso por 2 horas procedendo diluições seriadas em água peptonada até  $10^{-4}$ . Alíquotas de 20 µl foram transferidas para placas com meio MOX (Oxford Listeria agar base adicionado de Oxford Listeria Selective supplement) que foram incubadas a 37°C por 48 horas. Com auxílio de estereoscópio e iluminação angular de 45°C realizou-se a contagem das colônias bacterianas de *L. monocytogenes*.

### **3.2.11 Incorporação da bacteriocina P34 parcialmente purificada em envoltório natural de bovino (tripa) e avaliação de sua atividade frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644**

Foram recortados quadrados de 1,5 cm<sup>2</sup> de envoltório natural comestível (tripa) e depositados em placa de Petry estéril sendo vertido sobre os fragmentos 500 µl de bacteriocina P34 parcialmente purificada contendo 3200 UA/ml. No grupo controle foi vertido 500 µl de solução tampão fosfato 10 mM pH 7,0. Aguardou-se a secagem completa dos líquidos por cerca de 10 minutos e então se procedeu a configuração de 6 grupos experimentais, sendo: grupo 1 (controle) constituído pelo fragmento de envoltório natural comestível impregnado com 500 µl de solução tampão fosfato 10 mM pH 7,0 ; grupo 2 constituído pelo fragmento de envoltório natural comestível impregnado com 500 µl de bacteriocina P34 parcialmente purificada; grupos 3 e 4 constituídos pelos fragmentos de envoltório natural comestível impregnados com 500 µl de bacteriocina P34 parcialmente purificada previamente tratados a 100°C por 30 segundos e 10 minutos, respectivamente; grupos 5 e 6 constituídos pelos fragmentos de envoltório natural comestível impregnados com 500 µl de bacteriocina P34 parcialmente purificada previamente tratados a 4°C por 30 segundos e 10 minutos, respectivamente. Os envoltórios foram aplicados em placas com meio

TSA previamente inoculadas com *L. monocytogenes*. Os resultados foram interpretados como o aparecimento de halos de inibição em torno dos fragmentos de envoltório natural comestível após a incubação a 37°C por 24 horas.

### **3.2.12 *Análise Estatística***

Os resultados obtidos foram analisados pela comparação entre as médias, através do teste de *Tukey*, sendo as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Atividade antimicrobiana da bacteriocina P34 parcialmente purificada em diferentes linhagens de *Listeria* spp.

Foi testada a atividade anti-*Listeria* da bacteriocina P34 parcialmente purificada frente a diferentes linhagens de *Listeria* spp. em ágar TSB. Os resultados foram expressos a partir da observação de halos de inibição em torno dos discos de celulose estéreis depositados sobre o meio inoculado com a respectiva espécie ou linhagem. A partir disso pode-se determinar o valor das unidades de atividade, como a recíproca da maior diluição em que foi verificado halo, conseqüentemente maior sensibilidade do microrganismo à bacteriocina (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividade da bacteriocina P34 sobre diferentes espécies e linhagens de *Listeria* spp.

Microrganismo	Atividade UA/ml*
<i>Listeria monocytogenes</i> 4C	800
<i>Listeria monocytogenes</i> 7D78/03	800
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 4R	100
<i>Listeria innocua</i> 1572	400
<i>Listeria ivanovii</i> 5 NCTC 11007	200
<i>Listeria seeligeri</i> AC 82/4	400
<i>Listeria welchimeri</i> AC 73/2	800
<i>Listeria</i> sp.	400
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	800

\* determinação de unidades de atividade por mililitro.

Entre as diferentes espécies de *Listeria* testadas, as linhagens de *L. monocytogenes* foram as que apresentaram maior sensibilidade. A linhagem *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi escolhida como microrganismo indicador para os experimentos subseqüentes.

## 4.2 Efeitos da bacteriocina P34 frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644

Foi avaliada a atividade anti-listeria da bacteriocina P34 parcialmente purificada com relação à temperatura de refrigeração em placas com o microrganismo indicador em crescimento ou inoculado simultaneamente à adição da bacteriocina. Este experimento foi realizado em duplicata.

Conforme os resultados demonstrados na Tabela 2, houve diferenças significativas no diâmetro dos halos de inibição nos diferentes tempos de inoculação. As comparações foram realizadas entre os tempos de inoculação para cada diluição diferente. Para a concentração de 6400 UA/ml de bacteriocina P34 parcialmente purificada, a inibição foi maior no tempo zero. Na concentração de 3200 UA/ml, não houve diferença significativa entre os tempos, e, para a concentração de 1600 UA/ml de bacteriocina, houve maior inibição no tempo 24 horas.

Tabela 2 - Efeitos da bacteriocina P34 frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644

	Valores dos halos (em mm) para as diluições		
	6400 UA/ml	3200 UA/ml	1600 UA/ml
<b>P34 adic t = 0</b>	17,25 ± 1,06 a	13,50 ± 0,70 a	9,25 ± 0,35 a
<b>P34 adic t = 24 hs</b>	15,00 ± 0,0 b	13,25 ± 0,35 a	11,25 ± 0,35 b

P34 adic t = 0 – bacteriocina inoculada no tempo zero e placas incubadas a 5°C/8 dias

P34 adic t = 24 hs - bacteriocina inoculada no tempo 24 hs com *L. monocytogenes* crescida à 5°C e placas incubadas a 5°C/8 dias

## 4.3 Análise Microbiológica da lingüiça frescal de frango

Foi realizada análise microbiológica da lingüiça frescal de frango como procedimento inicial do experimento. Os resultados demonstram tratar-se de produto de acordo com os padrões legais vigentes segundo Resolução n° 12 de 02 de Janeiro de 2001 do Ministério da Saúde (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise Microbiológica da lingüiça frescal de frango

Ensaio	Resultados*
<i>Salmonella</i>	ausente em 25g
Coliformes Totais	21,0NMP/g
Coliformes Fecais	2,3NMP/g
Contagem padrão	1,75x10 <sup>4</sup> UFC/g
<i>Clostridium</i> Sulfito Redutor	ausente em 0,01g
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,5x10 <sup>2</sup> UFC/g

\* - não houve isolamento de *L. monocytogenes*.

#### 4.4 Pesquisa e isolamento de bactérias lácticas da lingüiça frescal de frango

Foram isoladas da lingüiça frescal de frango sem adição de cultura “starter” bactérias lácticas saprófitas que foram, conforme suas características morfológicas, (arredondadas, apigmentadas e translúcidas) classificadas aleatoriamente como L1, L2, L3, L4, L5 e L6. A partir disso foi testada a capacidade inibitória destas frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644. Os resultados demonstram diferenças significativas entre estas bactérias com relação ao tamanho do halo de inibição produzido, porém nenhuma diferença com relação à concentração da suspensão do microrganismo indicador utilizada, considerando-se  $p < 0,05$  (Tabela 4). Para este experimento foram utilizados 100 e 200 µl da suspensão de *L. monocytogenes* ATCC 7644 padronizada, correspondendo a 10<sup>2</sup> e 10<sup>3</sup> UFC/ml, respectivamente.

Tabela 4 - Teste de antagonismo de bactérias lácticas isoladas de lingüiça frescal de frango contra *L. monocytogenes* ATCC 7644.

Linhagem	Halo de inibição (mm)*	
	10 <sup>2</sup> UFC/ml	10 <sup>3</sup> UFC/ml
L1	7,5 ± 0,7 a	3,0 ± 4,2 a
L2	4,0 ± 1,4 b	6,5 ± 0,7 b
L3	2,0 ± 0,0 c	4,0 ± 0,0 b
L4	0,5 ± 0,7 e	1,0 ± 0,0 e
L5* <sup>1</sup>	0	0
L6	6,5 ± 0,7 a	6,0 ± 1,4 a

\* - Os valores são as médias de três determinações. \*<sup>1</sup> - Não houve observação de halos.

#### **4.5 Verificação de sinergismo entre bactérias lácticas presentes e bacteriocina P34 parcialmente purificada**

Os sobrenadantes brutos das bactérias lácticas não resultaram na formação de halos de inibição frente ao microrganismo indicador, *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Tabela 5). A bacteriocina P34 parcialmente purificada apresentou a formação de halos de inibição e demonstrou efeito sinérgico quando adicionada destes mesmos sobrenadantes brutos, pelo aumento no tamanho dos halos. Isto foi observado para os sobrenadantes brutos que tiveram seu pH inicial neutralizado com NaOH para 7,0 e para os sobrenadantes brutos não-neutralizados que apresentaram valores de pH entre 5,0 e 6,5.

Considerando-se  $p < 0,05$ , para as linhagens L1, L2 e L4, não houveram diferenças entre os tratamentos pois, os tratamentos apenas com a bacteriocina P34, no grupo P34, não diferiram de P34+N (sobrenadante bruto neutralizado) com nível de significância abaixo de 95% (93%) e de P34+NN (sobrenadante bruto não neutralizado) com nível de significância também abaixo de 95% (88%).

Para a linhagem L3, houve diferença entre os tratamentos P34 e P34+N, e nenhuma diferença entre P34+N e P34+NN.

L6 demonstrou diferença entre os tratamentos P34 e P34+N e P34+NN, porém nenhuma diferença entre os tratamentos com sobrenadante bruto neutralizado e sobrenadante bruto não-neutralizado (Tabela 5).

Tabela 5 - Teste de sinergismo entre sobrenadantes brutos de bactérias lácticas e bacteriocina P34 parcialmente purificada frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644

Linhagem	Halos de inibição (mm)*				
	N	NN	P34	P34+N	P34+NN
L1	0	0	15,7 ± 1,2 a	22,3 ± 4,9 a	21,3 ± 1,2 a
L2	0	0	17,3 ± 2,3 a	22,0 ± 2,0 a	21,7 ± 1,2 a
L3	0	0	16,3 ± 0,6 a	25,7 ± 3,8 b	22,0 ± 1,7 c
L4	0	0	18,3 ± 4,0 a	27,0 ± 5,2 a	24,3 ± 1,2 a
L6	0	0	15,7 ± 0,6 a	24,0 ± 1,0 b	21,0 ± 1,7 b

\* - Os valores são as médias de três determinações.

N = sobrenadante neutralizado

NN = sobrenadante não-neutralizado

P34 = bacteriocina P34 parcialmente purificada

P34+N = bacteriocina P34 parcialmente purificada e sobrenadante neutralizado

P34+ NN = bacteriocina P34 parcialmente purificada e sobrenadante não-neutralizado

#### 4.6 Avaliação da bacteriocina P34 parcialmente purificada incorporada na lingüiça frescal de frango artificialmente inoculada com *L. monocytogenes* ATCC 7644

A atividade antimicrobiana da bacteriocina P34 parcialmente purificada foi avaliada através da inoculação desta em lingüiça frescal de frango artificialmente inoculada com o microrganismo indicador, *L. monocytogenes* ATCC 7644. Durante sua recuperação nos intervalos do experimento, observa-se que a bacteriocina P34 parcialmente purificada inibiu a multiplicação do microrganismo *L. monocytogenes* ATCC 7644 no decorrer do experimento sob refrigeração.

A concentração de bacteriocina P34 parcialmente purificada incorporada à massa cárnea foi de 256 UA/g (6400 UA/ml) e do microrganismo indicador, *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi de  $8,8 \times 10^2$  UFC/g.

Durante o armazenamento sob refrigeração a 5°C o número de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) de *L. monocytogenes* ATCC 7644 diminuiu de 460 para 195 UFC/g ( $\neq 264$ ), onde, no grupo apenas com o microrganismo indicador, houve a redução de 532 para 364 indicando que a bacteriocina P34 parcialmente purificada possuiu atividade anti-listeria capaz de reduzir 95 UFC/g. Esta diminuição de UFC/g do grupo com a *L. monocytogenes* e a bacteriocina P34 parcialmente purificada ocorreu, principalmente, do dia zero para o dia três, o que não

pôde ser evidenciado quando comparamos os intervalos três dias com sete dias e sete dias com dez dias, apesar de ter ocorrido uma redução de 329 para 265 UFC/g e de 265 para 195 UFC/g respectivamente, não sendo, as diferenças, nestes tempos do experimento, significativas com  $p < 0,05$ .

Observa-se que o grupo que continha somente *L. monocytogenes* apresentou uma redução significativa no número de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) do tempo zero ao dia três ( $p < 0,05$ ). Porém, quando comparada do dia três ao dia sete e deste ao dia dez, não houve redução significativa apesar de ocorrer a redução no número de UFC/g (Figura I).

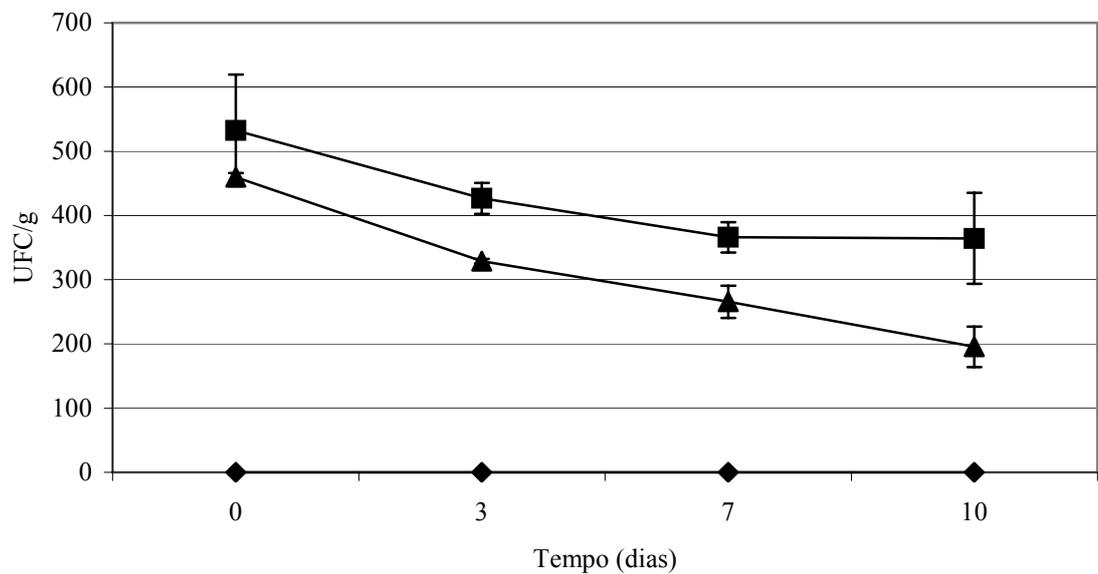


Figura 1 - Efeito da bacteriocina P34 parcialmente purificada no crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 artificialmente inoculada em lingüiça fresca de frango. ■ – grupo com *L. monocytogenes*; ▲ - grupo com *L. monocytogenes* e bacteriocina P34 parcialmente purificada; ◆ - grupo controle. Cada ponto representa a média  $\pm$ desvio padrão de quatro determinações

#### 4.7 Comparação dos efeitos da nisina e bacteriocina P34 parcialmente purificada em lingüiça fresca de frango artificialmente inoculada com *L. monocytogenes* ATCC 7644

O comportamento dos diferentes grupos tratados com bacteriocina P34 parcialmente purificada, nisina e ambas nos dias zero e dez da inoculação sob temperatura de refrigeração pode ser observado na Figura 2.

Pode-se notar que houve diferenças significativas entre os grupos *L. monocytogenes* e nisina (Lm + Nis), *L. monocytogenes* e 50% de Nisina com 50% de bacteriocina P34 parcialmente purificada (Lm e P34+Nis), bacteriocina P34 e nisina (P34 e Nis), bacteriocina P34 parcialmente purificada e 50% de bacteriocina P34 parcialmente purificada com 50% de nisina (P34 e P34+Nis), nos dois intervalos do experimento.

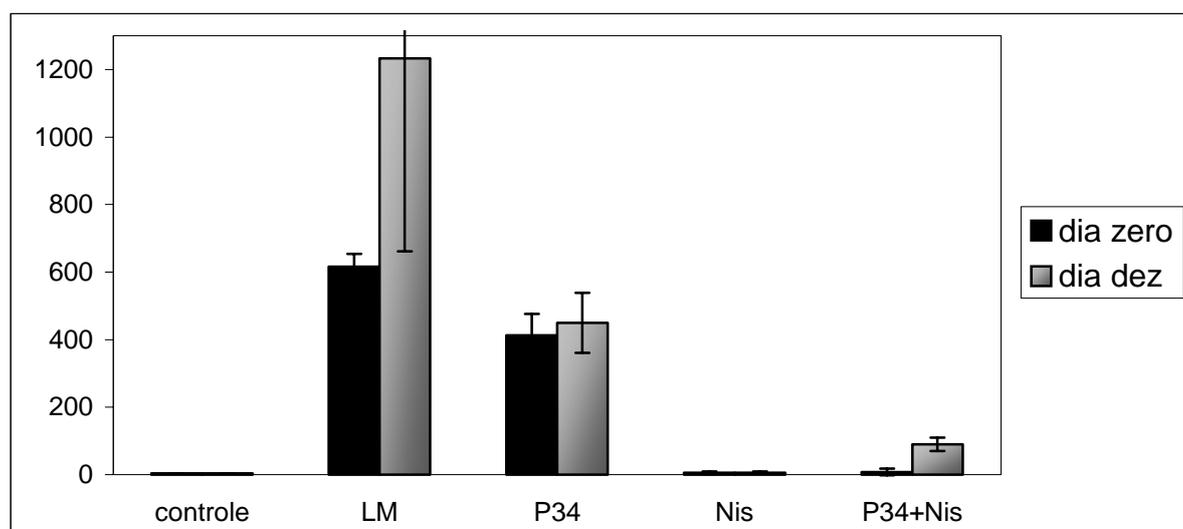


Figura 2 - Crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 em lingüiça fresca de frango artificialmente inoculada sob tratamento com bacteriocina P34 e nisina no período de dez dias sob resfriamento

#### 4.8 Avaliação da bacteriocina P34 adsorvida em envoltório de lingüiça frescal de frango frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644

A atividade antimicrobiana da bacteriocina P34 parcialmente purificada foi testada nos envoltórios naturais comestíveis (tripas de bovinos semi-secas salgadas) utilizados na lingüiça frescal de frango frente ao microrganismo indicador, *L. monocytogenes* ATCC 7644. A Figura 3 ilustra o halo de inibição produzido pelo envoltório natural comestível contendo bacteriocina P34 parcialmente purificada e tratada à 4°C/30seg. Frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644.



Figura 3 - Halo de inibição de envoltório natural comestível contendo a bacteriocina P34 parcialmente purificada tratado à 4°C/30seg frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644

Os resultados como halos de inibição em milímetros da bacteriocina incorporada ao envoltório frente ao patógeno sob diferentes tratamentos térmicos são apresentados na Tabela 6. Pode-se notar que todos os grupos, exceto o grupo controle, que não levou a adição da bacteriocina P34 parcialmente purificada, mostraram atividade, ou seja, produziram halos de inibição em torno dos fragmentos de tripa tratada após os tratamentos aplicados nestas.

Tabela 6 - Resultados de atividade da bacteriocina P34 parcialmente purificada incorporada em tripas naturais frente à *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

<b>Grupos</b>	<b>Halos de inibição em mm*</b>
<b>Controle</b>	0
<b>P34</b>	4,7 ± 0,6
<b>P34 + 100°C/30''</b>	4,2 ± 1,0
<b>P34 + 100°C/10'</b>	4,3 ± 0,8
<b>P34 + 4°C/30''</b>	4,3 ± 1,2
<b>P34 + 4°C/10'</b>	4,0 ± 0,5

\* = Os valores são as médias de três determinações

## 5 DISCUSSÃO

A bacteriocina P34 demonstrou atividade inibitória *in vitro* contra várias linhagens de *Listeria* spp., como *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria monocytogenes* 4C, *Listeria monocytogenes* 7D78/03, *Listeria innocua* ATCC 33090 4R, *Listeria innocua* 1572, *Listeria ivanovii* 5 NCTC 11007, *Listeria seeligeri* AC 82/4 e *Listeria welchimeri* AC 73/2, em ágar TSB e definidos em unidades de atividade por mililitros de bacteriocina.

A sensibilidade das linhagens de *L. monocytogenes* observada sugere a elevada efetividade da bacteriocina P34 parcialmente purificada como agente antimicrobiano contra este importante patógeno. Conforme anteriormente já descrito por Motta (2006), a bacteriocina P34 possui efeito bactericida e bacteriolítico sobre *L. monocytogenes* spp. pela diminuição das células viáveis durante a fase exponencial de crescimento celular bacteriano.

O efeito da bacteriocina P34 parcialmente purificada sobre *L. monocytogenes* ATCC 7644 em diferentes tempos de inoculação à temperatura de refrigeração demonstrou haver diferenças. Nesta temperatura de 5°C, ocorrem mudanças na composição dos agentes de membrana da *L. monocytogenes* dificultando a ação das bacteriocinas. O que pode ser evidenciado em estudos que avaliaram *L. monocytogenes*, inoculada em sistema cárneo-modelo, com bacteriocinas (enterocinas A e B, sacacina K, pediocina AcH e nisina). Sob temperatura de refrigeração e mantida até o final da estocagem (61 dias) a *L. monocytogenes* não foi inibida pois, a contagem deste microrganismo nos tratamentos com as bacteriocinas sacacina, enterocina ou pediocina foi mantida em  $10^2$  UFC/g (GARRIGA *et al.*, 2002a).

Todos os alimentos apresentam uma microbiota natural extremamente variável aliada àquela que pode estar presente em decorrência das diversas etapas que levam à obtenção de produtos processados, estando estes alimentos sujeitos à contaminação por diferentes microrganismos provenientes de manipulação inadequada, contato com equipamentos, superfícies e utensílios e pela atmosfera ambiental.

Produtos cárneos, principalmente os minimamente processados, também podem apresentar vários tipos de microrganismos benéficos e prejudiciais à saúde do consumidor. Dentre esta microbiota natural, é comum a presença de bactérias lácticas em alimentos cárneos resfriados como contaminantes naturais ou saprófitas

destes produtos. Dentre os microrganismos prejudiciais pode estar presente *L. monocytogenes* microrganismo patogênico importante freqüente nas plantas de abate avícolas e contaminar os produtos frescos, antes mesmo destes saírem da indústria, prejudicando a saúde do consumidor (LOVETT, 1989). Pela análise microbiológica, pode-se verificar que o produto lingüiça frescal de frango usada neste trabalho encontra-se dentro dos padrões legais vigentes no país.

Freqüentemente produtos que não levam adição de culturas “starter” em sua formulação apresentam bactérias lácticas em sua microbiota. Quatro cepas de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas, que apresentaram atividade anti-listeria, foram isoladas de cerca de 20 amostras de carnes e produtos cárneos brasileiros sem adição de culturas “starter”, utilizando o método de antagonismo em ágar e *Lactobacillus sake* ATCC 15521 como microrganismo indicador (DE MARTINIS *et al.*, 2001).

Mais de 200 linhagens de bactérias lácticas foram isoladas de seis amostras de pernil desossado curado e três amostras de salame tipo italiano artesanal onde, pelo teste de inibição direta, 59 delas foram capazes de inibir *in vitro* o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* e de *Staphylococcus aureus*, demonstrando a produção de compostos inibitórios (DABÉS; SANTOS; PEREIRA, 2000).

A lingüiça frescal de frango apresentou, em sua microbiota, bactérias lácticas, capazes de causar inibição do crescimento de *L. monocytogenes* (antagonismo direto) tanto para concentração de  $10^2$  como  $10^3$  UFC/g do microrganismo indicador, mantendo o diâmetro de seu halo inibitório aproximadamente constante. Entretanto, quando foram utilizados os sobrenadantes brutos das bactérias lácticas, não foi verificada atividade anti-listeria sobre o microrganismo indicador. Além da produção de substâncias antimicrobianas, esta atividade antimicrobiana pode ter ocorrido devido à linhagem da bactéria láctica a ser avaliada e o microrganismo indicador se desenvolverem simultaneamente, a inibição pode ser provocada por competição pelos nutrientes do meio (HOLZAPFEL; GEISEN; SCHILLINGER, 1995).

Analisando os efeitos de antagonismo indireto frente ao microrganismo indicador, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, os sobrenadantes brutos das bactérias lácticas isoladas neste trabalho apresentaram sinergismo quando combinados com a bacteriocina P34 parcialmente purificada. Os resultados demonstraram aumento do halo de inibição, tanto os sobrenadantes brutos que tiveram seu pH inicial neutralizados, quanto os sobrenadantes brutos não-neutralizados (pH

entre 5,0 e 6,5). Estes resultados sugerem que este sinergismo não ocorre pela presença de ácidos orgânicos, uma vez que, foi mantido o pH em torno de 7,0 (HOLZAPFEL; GEISEN; SCHILLINGER, 1995). As linhagens L1, L2, L3, L4, L5 e L6 podem ser produtoras de substâncias antimicrobianas tipo bacteriocinas, entretanto a quantidade secretada para o meio sem a presença da bacteriocina P34 parcialmente purificada, nas condições do experimento, pode ter sido insuficiente para inibir *L. monocytogenes*. Além disso, bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas muitas vezes permanecem adsorvidas às células, necessitando pH < 3,0 para máxima liberação (HURST, 1983).

Estudos com sobrenadantes de cultivos de *Lactobacillus bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. lactis* e *L. helveticus* isolados de laticínios da Turquia apresentaram efeito inibitório contra as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*. Todas estas bactérias lácticas demonstraram atividade antimicrobiana para as bactérias teste. Porém, somente três culturas de *Lactobacillus* spp. demonstraram atividade antibacteriana, tanto no sobrenadante bruto da cultura com pH ajustado entre 6,5-7,0 como para este sobrenadante tratado com catalase. Este resultado indicou que os sobrenadantes das culturas de *Lactobacillus* inibiram *S. aureus*, *E. coli* e *Y. enterocolitica* devido à produção de peróxido de hidrogênio (ASLIM *et al.*, 2005).

O pH do meio é de extrema importância pois as lactoestreptocinas, por exemplo, são estáveis e ativas em valores de pH entre 4,2 e 5,0 e reversivelmente inativadas nos valores de pH 7,0 e 8,0 (YANG *et al.*, 1992).

O estudo da influência da temperatura e do pH sobre a atividade das bacteriocinas vem interessando a comunidade científica. Pesquisadores avaliaram a capacidade de *Pediococcus acidilactici* JBL 1095 produzir bacteriocina e inibir *L. monocytogenes* em amostras de salsichas formuladas com carne bovina e embaladas a vácuo, mantidas a 4°C ou a 25°C. Conforme observado, a 4°C não houve produção de bacteriocina, enquanto a 25°C, em presença de *P. acidilactici* JBL 1095, houve uma redução de 2,7 ciclos logarítmicos no número de células de *L. monocytogenes* (DEGNAN; YOUSEF; LUCHANSKY, 1992).

Algumas bacteriocinas possuem seu potencial de ação e características bem determinadas como antimicrobiano, assim como sua possível aplicação como conservante de alimentos. Porém, a única bacteriocina permitida para uso em alimentos é produzida por uma bactéria láctica, considerada GRAS (generally regarded as safe) pelo Food and Drug Administration (FDA), a nisina, (MONTVILLE,

WINKWOSKI, 1997), que possui um amplo espectro como bioconservante, mas que possui aplicação restrita em carnes devido à sua baixa solubilidade, distribuição desuniforme e baixa estabilidade, além de ser inativada pela glutathione S-transferase, enzima natural da carne (BROMBERG *et al.*, 2006; ENNAHAR; SONOMOTO; ISHIZAKI, 1999). O agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol, inativa a bacteriocina P34 (MOTTA *et al.*, resultados não publicados) sugerindo que o efeito antimicrobiano da bacteriocina P34 possa ser também susceptível à glutathione S-transferase.

As bacteriocinas pertencentes à Classe I tem condições de inibir um número maior de linhagens de *Listeria* spp. (ENNAHAR; SONOMOTO; ISHIZAKI, 1999), porém nem todas bacteriocinas demonstram significativa atividade anti-*Listeria*. O efeito combinado da embalagem em atmosfera modificada e da adição da cepa produtora de bacteriocina *L. sake* 2a na multiplicação de *L. monocytogenes* em lingüiça frescal, embalada com filme plástico permeável ao oxigênio, 100% CO<sub>2</sub> ou 50% + 50%N<sub>2</sub> e mantida a 6°C foi avaliado e os resultados indicaram que a embalagem em atmosfera modificada teve um efeito antilisteria mais acentuado que a simples adição de *L. sake* 2a produtor de bacteriocina (LISERRE; FRANCO, 2002).

A bacteriocina P34 parcialmente purificada inibiu o microrganismo *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 em lingüiça frescal de frango com valores constantes durante todo o experimento. O grupo que não continha a bacteriocina P34 parcialmente purificada apresentou uma contagem de UFC/g significativamente superior que se manteve em todos os intervalos do experimento. Isto pode ser esperado pelo fato do patógeno *L. monocytogenes* ser capaz de sobreviver, sem multiplicar-se, por longos períodos de estocagem a 4°C em salsichas, presunto e carne de peru (FARBER; DALEY, 1994), por exemplo.

Além da avaliação dos efeitos da bacteriocina P34 parcialmente purificada em lingüiça frescal de frango artificialmente contaminada com *L. monocytogenes* ATCC 7644, foi realizado experimento comparando os efeitos da bacteriocina nisina sob as mesmas condições. Neste experimento, a bacteriocina P34 parcialmente purificada apresentou a mesma atividade antimicrobiana que no experimento anterior, porém, a nisina mostrou-se muito mais eficiente, nas condições citadas, chegando a inibir quase que completamente o microrganismo indicador, *L. monocytogenes* ATCC 7644.

Estudos recentes demonstram o efeito anti-*Listeria* da nisina quando combinada com algum tipo de aditivo alimentar. Samelis *et al.* (2005) demonstraram o

efeito combinado entre a bacteriocina nisina e ácidos orgânicos e sais (3 a 5 g/100 ml de ácido acético ou 3 g/100 ml de benzoato de potássio) sobre carne suína picada estocada à 4°C sob atmosfera modificada resultando em efeito bactericida até 90 dias de exposição. Pawar *et al.* (2000) demonstraram o efeito inibitório em combinação com 2% NaCl em carne de búfalo crua.

Diante destes resultados pode-se inferir que algum componente da lingüiça frescal de frango pode ter concorrido para a interação entre a bacteriocina P34 e a bacteriocina nisina ou ainda que pode ter ocorrido efeito de diluição da nisina pela bacteriocina P34, sendo necessários experimentos mais detalhados para elucidação. Principalmente levando-se em conta a baixa solubilidade da nisina em carnes (DE MARTINIS *et al.*, 2002). Além disso, estudos que mostram linhagens de *L. monocytogenes* com elevada resistência à nisina indicam a necessidade de pesquisar novos compostos anti-listeria.

A bacteriocina nisina, conforme alguns autores, possui uso restrito em embalagens, pois é pouco efetiva para carnes frescas, demonstrando atividade anti-listeria quando combinada com atmosfera modificada e atuante principalmente em ambientes com baixo pH. A combinação de nisina adicionada de um agente quelante mostra ser efetiva sobre *L. monocytogenes* em embalagens para alguns tipos de carnes processadas (OLIVEIRA; PADULA, 2006).

Entretanto, escassas pesquisas relacionam a atividade de bacteriocinas com adsorção a superfícies. A bacteriocina P34 parcialmente purificada foi testada incorporada ao envoltório da lingüiça frescal de frango e inibiu, *in vitro*, o microrganismo indicador *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Neste experimento, os diferentes tratamentos empregados não demonstraram diferenças significativas quanto à atividade anti-listeria da bacteriocina P34. Isto sugere que não houve influência de temperatura, sob as condições do experimento, uma vez que esta bacteriocina apresenta termoestabilidade e somente perde a atividade após 30 minutos a 100°C (MOTTA, 2006).

Outras bacteriocinas como a bacteriocina 8AI produzida pelo *Bacillus cereus* 8A também demonstrou efeito anti-listeria. Esta bacteriocina inibiu *L. monocytogenes* ATCC 7644 quando incorporada em embalagens de polietileno e poliestireno expandido usadas na industrialização de alimentos (BIZANI, D.; MORRISY; BRANDELLI 2002).

Além de serem necessários estudos específicos, mas, conforme os estudos realizados neste trabalho e com os resultados até então observados, pode-se inferir que a bacteriocina P34 parcialmente purificada apresenta efeito antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

## 6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir dos resultados obtidos neste trabalho:

- As bactérias lácticas presentes na lingüiça frescal de frango apresentaram efeito antagônico direto frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644.
- Alguns dos sobrenadantes brutos das bactérias lácticas presentes na lingüiça frescal de frango apresentaram sinergismo com a bacteriocina P34 parcialmente purificada frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644.
- A bacteriocina P34 parcialmente purificada inibiu *L. monocytogenes* ATCC 7644 e outras espécies e linhagens de *Listeria in vitro*.
- A bacteriocina P34 parcialmente purificada inibiu *L. monocytogenes* ATCC 7644 em temperatura de refrigeração em diferentes tempos de inoculação.
- A bacteriocina P34 parcialmente purificada demonstrou atividade inibitória quando testada em lingüiça frescal de frango artificialmente inoculada com *L. monocytogenes* ATCC 7644 sob temperatura de resfriamento durante 10 dias.
- Houve sensibilidade *in vitro* do patógeno alimentar *L. monocytogenes* ATCC 7644 frente à bacteriocina P34 parcialmente purificada incorporada em envoltórios naturais comestíveis de lingüiça frescal de frango.
- A nisina apresentou efeito anti-listeria superior ao da bacteriocina P34 parcialmente purificada em lingüiça frescal de frango artificialmente inoculada com *L. monocytogenes* ATCC 7644.

## BIBLIOGRAFIA

ALTENA, K.; GUDER, A.; CRAMER, C.; BIERBAUM, G. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, Washinton, v. 66, p. 2565-2571, 2000.

ASLIM, B.; YUKSEKDAG, Z.N.; SARIKAYA, E.; BEYATLI, Y. Determination of the bacteriocin-like substance produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 38, p. 691-694, 2005.

ASSIS, M.A.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G. M.; LANDGRAF, M. Incidence of *Listeria* spp. and *Salmonella* spp. in horsemeat for human consumption. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, p. 161-164, 2000.

BENEDICT, R.C. *Listeria monocytogenes*: physiology and metabolism. In: MILLER, A.J.; SMITH, J.L.; SOMKUTI, G.A. (Ed.). **Foodborne listeriosis**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 13-24.

BERSOT, L.S.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Science**, Barking, v. 57, p. 13-17, 2001.

BIZANI, D.; MORRISY, J.A.C.; BRANDELLI, A. Utilização da bacteriocina 8A para inibição de *Listeria monocytogenes* em embalagens de alimentos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado. **Anais...** Gramado: 2002.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 2 de Janeiro de 2001. Revoga a Portaria SVS/MS Lei no 451, de 19 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

BREDHOLT, S.; NESBAKKEN, T.; HOLCK, A. Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas-packaged meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 53, p. 43-52, 1999.

BUCHANAN, R.L.; PHILLIPS, J.G. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and

atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, p. 370-376, 1990.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. Características da Bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 135-144, 2006.

BUNCIC, S.; PAUNOVIC, L.; RADISIC, D. The fate of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages and in vacuum-packaged frankfurters. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 54, p. 413-417, 1991.

CAMPILLO, J.I.G.; DOMÍNGUEZ-FERNÁNDEZ, M.C.; ZUMALACÁRREGUI-RODRÍGUEZ, J.M. Incidencia de *Listeria monocytogenes* y *Eschericia coli* O157:H7 en carnes y productos carnicos comercializados en Castilla y Leon. **Alimentaria**, Madrid, v. 303, p. 71-75, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDCP). . Multistate outbreak of listeriosis – United States, 1998-1999. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 47, n. 51-52, p. 1117-1118, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDCP). Multistate outbreak of listeriosis - United States, 2000. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. 50, p. 1129-1130, 2000.

CHAGAS, S.S. **Tecnologia de produtos de origem animal**. 1995. 30f. Anotações de aula. Disciplina Tecnologia dos Produtos de Origem Animal. Curso de Graduação em Medicina Veterinária, UFSM, RS, 1996/2.

CHEN, N.; SHELEF, L.A. Relationship between water activity, salts of lactic acids, and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat system. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 8, p. 574-578, 1992.

CLEVELAND, J. Et al. Bacteriocins: safe antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 1-20, December 2001.

COLBURN, K.G.; KAYSNER, C.A.; ALBEYTA, C.; WEKELL, M.M. *Listeria* species in a California coast estuarine environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 7, p. 2007-2011, 1990.

CUTTER, C.N. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 5, p. 601-607, 2000.

DABÉS, A.C.; SANTOS, W.L.M.; PEREIRA, E.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 1, p. 136-140, 2001.

DALY, W.E.; SANDINE, P.R.; ELLIKER, C. Interactions of food starter cultures and food-borne pathogens: *Streptococcus diacetylactis* versus food pathogens. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, v. 35, p. 349-357, 1970.

DEGNAN, A.J.; YOUSEF, A.E.; LUCHANSKY, J.B. Use of *Pediococcus acidilactici* to control *Listeria monocytogenes* in temperature-abused vacuum-packaged wieners. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 2, p. 98-103, 1992.

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**, New York, v. 18, n. 2-3, p. 191-208, 2002.

DE MARTINIS, E.C.P.; CRANDALL, A.D.; MAZZOTA, A.S.; MONTVILLE, T.J. Influence of pH, salt, and temperature on nisin resistance in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 4, p. 420-423, 1997.

DE MARTINIS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 119-126, 1998.

DE MARTINIS, E.C.P.; PÚBLIO, M.R.P.; 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**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 32-37, 2001.

DESTRO, M.T.; SERRANO, A. M.; KABUKY, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, Guildford, v. 2, p. 110-112, 1991.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. **Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications**. London: Blackie Academic & Professional, 1994, 540 p.

DONALD, A. S.; FENLON, D. R.; SEDDON, B. The relationship between ecophysiology, indigenous microbiota and growth of *Listeria monocytogenes* in grass silage. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 79, p. 141-148, 1995.

DONNELLY, C.W. *Listeria monocytogenes*. In: HUI, Y.H.; GORHAM, J.R.; MURREL, K.D.; CLIVER, D.O. (Ed.). **Foodborne disease handbook**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 215-252.

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

ENNAHAR, S.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class Iia bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 87, n. 6, p. 705–716, 1999.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiology Review**, New York, v. 55, n. 4, p. 476-511, 1991.

FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; DUNFIELD, S.; PRESCOTT, R. The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 9, p.181-183, 1989.

FENLON, D.R. *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (Ed.). **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 21-37.

FENLON, D.R. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 59, p. 537-543, 1985.

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 Bacteriology**, Oxford, v. 81, p. 641-650, 1996.

FLEMING, D.W.; COCHI, S.L.; MACDONALD, K.L.; BRODUM, J.; HAYES, P.S.; PLIKAYTIS, B.D.; HOMES, M.B.; AUDURIER, A.; BROOME, C.V.; FRANCES, N.; HORNBY, H.; HUNTER, P.R. The isolation of *Listeria* species from fresh water sites in Cheshire and North Wales. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 107, p. 235-238, 1991.

GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T.; COSTA, S.; MONFORT, J.M.; HUGAS, M. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. **Food Microbiology**, London, v. 19, n 5, p. 509-518, 2002.

GELLIN, B.G.; BROOME, C.V. Listeriosis. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 261, p. 1313-1320, 1989.

GENIGEORGIS, C.A.; OANCA, P.; DUTULESCU, D. Prevalence of *Listeria* spp. in Turkey meat at the supermarket and slaughterhouse level. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 4, p. 282-288, 1990.

GUERRA, M.F.; BERNARDO, F.A. O risco da listeriose e a identificação do perigo – revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 99, p. 69-76, 2004.

GOMEZ, F.P. **Estatística experimental**. 11.ed. Piracicaba: Nobel, 1985. 403p.

GRAU, F.H.; VANDERLINDE, P.B. Occurrence, numbers, and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 1, p. 4-7, 1992.

HAO, Y.; BRACKETT, R.E.; DOYLE, M.P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plants extracts in refrigerated cooked beef. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, p. 307-312, 1998.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Regular, nonsporing gram-positive rods: Genus *Listeria*. In: HENSLEY, W.R. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams Wilkins, 1994. p. 565-570.

HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, p.343-362, 1995.

HUDSON, J.A.; MOTT, S.J.; DELACY, K.M.; EDRIDGE, A.L. Incidence and coincidence of *Listeria* spp., motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* on ready-to-eat meat fleshfoods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 99-108, 1992.

HURST, A. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In: BRANEN, A.L. DAVIDSON, P.M. (Ed.). **Antimicrobial in foods**. New York: Marcel Dekker, 1983. p. 327-351.

HURST, A.; HOOVER, D. G. Nisin. In: DAVIDSON, P.M.; BRANEN, A.L. (Ed.). **Antimicrobials in foods**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 369-394.

JAY, J.M. Foodborne listeriosis. In: JAY, J.M. (Ed.). **Modern food microbiology**. New York: AVI, 1996. Cap. 22, p. 478-506.

JOHNSON, J.L., DOYLE, M.P.; CASSENS, R.G.; SCHOENI, J.L. Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 2, p. 497-501, 1988.

JOHNSON, J.L.; DOYLE, M.P.; CASSENS, R.G. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 1, p. 81-91, 1990.

JUNCHER, D.; VESTERGAARD, C.S.; SOLTOFT-JENSEN, J.; WEBER, C.J.; BERTELSEN, G.; SKIBSTED, L.H. Effects of chemical hurdles on microbiological and oxidative stability of a cooked cured emulsion type meat product. **Meat Science**, Barking, v. 55, n. 4, p. 483-491, 2000.

KANG, D.; FUNG, D.Y.C. Thin agar layer method for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 11, p. 1346-1349, 1999.

KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, p. 2939-2845, 1995.

KIMURA, H.; SASHIHARA, T.; MATSUSAKI, H.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, Novel bacteriocin of *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from well-aged bed of fermented rice bran. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v. 864, n. 1, p. 345-348, 1998.

KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, Paris, v. 70, n. 3, p. 337 – 349, March 1988.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 12, n. 1-3, p. 39-86, 1993.

KOMINSKY, G.M.M.R. **Avaliação da sensibilidade de microorganismos selecionados a diferentes concentrações de nisina em salsichas comuns e de frango.** 1997. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

KOZAK, W.; BARDOWSKI, J.; DOBRZANSKI, W.T. Lactostrepcins acid bacteriocins produced by lactic streptococci. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 45, n. 2, p. 247-257, 1978.

LE MARC, Y.; HUCHET, V.; BOURGEOIS, C.M.; GUYONNET, J.P.; MAFART, P.; THUAULT, D. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH, organic acid concentration. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 2-3, p. 219-237, 2002.

LISERRE, A.M. FRANCO, B.D.G.M. Application of a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain to prevent growth of *Listeria monocytogenes* in Brazilian sausages (lingüiça) packaged under modified atmosphere. **Meat Science**, Barking, v. 61, n. 4, p. 449-455, 2002.

LOVETT, J. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P. (Ed.). **Food-borne pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 283-310.

LOVETT, J.; TWEDT, R. M. *Listeria*. **Food Technology**, Chicago, v. 42, p. 188-191, 1988.

MAYR-HARTING, A.; HEDJES, A.J.; BERKELEY, C.W. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W. (Ed.). **Methods in microbiology**. New York, Academic Press, 1972. v.7

McKELLAR, R.C. Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 12, p. 4219-4223, 1994.

McKELLAR, R.C.; MOIR, R.; KALAB, M. Factors influencing the survival and growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of Canadian retails wieners. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 5, p. 387-392, 1994.

McLAUHLIN, J. The identification of *Listeria* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 77-81, 1997.

McLAUCHLIN, J.; HALL, S.M.; VELANI, S.K.; GILBERT, R. J. Human listeriosis and pate: a possible association. **British Medical Journal**, Edinburgh, v. 303, n. 6805, p. 773-775, 1991.

MCAULIFFE, O.; ROSS, R.P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 25, p. 285-308, 2001.

MONTVILLE, T.J.; WINCOWSKI, K. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In : DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. Food Microbiology: fundamentals and frontiers. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1997.

MOTTA, A.S. **Produção, purificação e caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por uma linhagem de Bacillus sp. P34**. 2006. 147 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MURIANA, P.M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Suppl., p. 54-63, 1996.

MURIANA, P.M.; QUIMBY, W.; DAVIDSON, C.A.; GROOMS, J. Postpackage pasteurization of ready-to-eat deli meats by submersion heating for reduction of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 6, p. 963-969, 2002.

NERBRINK, E.; BORCH, E.; BLOM, H.; NESBAKKEN, T. A model based on absorbance data on the growth rate of *Listeria monocytogenes* and including the effects of pH, NaCl, Na-lactate and Na-acetate. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 47, n. 1-2, p. 99-109, 1999.

NES, I.F.; DIEP, D.B.; HAVARSTEIN, L.S.; BRURBERG, M.I.; EIJSINK, V.; HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 70, n. 2, p. 113-128, 1996.

NIKU-PAAVOLA, M. -L.; LAITILA, A.; MATTILA-SANDHOLM, T.; HAIKARA, A. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 1, p. 29-35, 1999.

OLIVEIRA, L.M.; PADULA, M. Embalagens plásticas com agentes antimicrobianos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL ABRAPA DE INOCUIDADE DE ALIMENTOS, 4., 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ABRAPA, 2006.

PAWAR, D.D.; MALIK, S.V.S.; BHILEGAONKAR, K.N.; BARBUDDHE, S.B. Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. **Meat Science**, Barking, v. 56, p. 215-219, 2000.

PHAN-THANH, L.; MAHOUI, F.; ALIGÉ, S. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 55, n. 6, p. 121-126, 2000.

PRADO, C.S.; SANTOS, W.L.M.; CARVALHO, C.R.; MOREIRA, E.C.; COSTA, J.O. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 4, p. 417-423, 2000.

PORTO, A.C.S. **Capacidade de sobrevivência e termorresistência de *Listeria monocytogenes* em salsichas formuladas, com e sem a adição de lactato de potássio, embaladas a vácuo e armazenadas a -18 °C, 4 °C e 10 °C.** 2003. 176 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

QVIST, S.; SEHESTED, K.; ZEUTHEN, P. Growth suppression of *Listeria monocytogenes* in a meat product. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 1-2, p. 283-293, 1994.

ROCOURT, J. Taxonomy of the genus *Listeria*. **Infection**, Munchen, v. 16, suppl. 2, p. S89-91, 1988.

ROCOURT, J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T; MARTH, E.H. (Ed). **Listeria, listeriosis and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 1-20.

ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (Ed.). **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: American Society for Microbiology Press, 1997. p. 337-352.

RYSER, E.T. Foodborne listeriosis. In: RYSER, E.T; MARTH, E.H. (Ed.). **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker. 1999. p. 299-357.

RYSER, E.T; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F. P.; KEITH, I. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Assoc. 2001. p. 343-356.

RYSER, E.T.; MARTH, E.H. Listeriosis in humans. In: RYSER, E.T; MARTH, E.H. (Ed.). **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker. 1991. p. 45-65.

SAMELIS, J.; BEDIE, G.K.; SOFOS, J.N.; BELK, K.E.; SCANGA, J.A.; SMITH G.C. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 38, p. 21-28, 2005.

SAMELIS, J., BEDIE, G.K.; SOFOS, J.N.; BELK, K.E.; SCANGA, J.A.; SMITH, G.C. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials after postprocess contamination and extended storage of frankfurters at 4°C. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 10, p. 299-307, 2002.

SAMELIS, J.; STAVROPOULOS, S.; KAKOURI, A.; METAXOPOULOS, J. Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented greek dry salami. **Food Microbiology**, London, v.11, p.447-460, 1994.

SANZ, B., SELGAS, D., PAREJO, I.; ORDONEZ, J.A. Characteristics of *lactobacilli* isolated from dry fermented sausages. **International of Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.6, n. 3, p.199-205, 1988.

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C.V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 4, n. 2, p. 169-183, 1991.

SEELINGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, N.E.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of sistematic bacteriology**. Baltimore, The Willians Wilkins, 1986a. v. 2, p. 1235-1245.

SEELINGER, H.P.R.; JONES, D. Regular, nonsporing gram-positive rods. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, N.E.; HOLT, J.G. (Ed.). **Berguey's Manual of Sistematic Bacteriology**. Baltimore: Willians Wilkins. 1986b. v. 3, p. 1235-1245.

SEMAN, D. L.; BORGER, A.C.; MEYER, J.D.; HALL, P.A.; MILKOWSKI, A.L. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in cured ready-to-eat processed meat products by manipulation of sodium chloride, sodium diacetate, potassium lactate, and product moisture content. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 4, p. 651-658, 2002.

SHELEF, L.A. Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef or liver during storage at 4 and 25°C. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 52, n. 2, p. 379-383, 1989.

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans. In: RYSER, E. T; MARTH, E. H. (Ed.). **Listeria, listeriosis and food safety**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 75-95.

SOFOS, J.N.; BEUCHAT, L.R.; DAVIDSON, P.M.; JOHNSON, E.A. **Naturally occurring antimicrobials in food**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 103 p. (Council for Agricultural Science and Technology. Task Force Report n.132.).

SULLIVAN, L.O; ROSS, R.P.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, Paris, n. 84, n. 5-6, p. 593-604, 2002.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, Washington, v. 40, n. 3, p. 722 – 756, 1976.

TAPPERO, J.; SCHUCHAT, A.; DEEVER, K.; MASCOLA, L.; WENGER, J.D. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness on prevention efforts. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 273, n. 14, p.1118-1122, 1995.

TERRA, N.N. Princípio de fermentação de produtos cárneos (culturas "Starter"). **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n. 19, p. 35-37, jan. 1993.

THAYER, D.W.; BOYD, G. Irradiation and modified atmosphere packaging for the control of *Listeria monocytogenes* on turkey meat. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 10, p. 1136-1142, 1999.

THAYER, D.W.; BOYD, G. Reduction of normal flora by irradiation and its effect on the ability of *Listeria monocytogenes* to multiply on ground turkey meat stored at 7° C when packaged under modified atmosphere. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 12, p. 1702-1706, 2000.

TIENUNGOON, S.; RATKOWSKY, D.A.; McMEEKIN, T.A.; ROSS, T. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic

acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 11, p. 4979-4987, 2000.

TOMPKIN, R.B.; CHRSTIANSEN, L.N.; SHAPARIS, A.B.; BAKER, R.L.; SCHROEDER, J.M. Control of *Listeria monocytogenes* in processed meats. **Food Australia**, North Sydney, v. 44, n. 8, p. 370-376, 1992.

VANDERLINDE, P.B.; GRAU, F.H. Detection of *Listeria* spp. in meat and environmental samples by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 54, n. 3, p. 230-231, 1991.

VARGAS, A.C. **Doenças infecciosas dos animais domésticos**. 1996. 70 f. Anotações de aula. Disciplina Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos. Curso de Graduação em Medicina Veterinária, UFSM, RS, 1996/2.

VELANI, S.; GILBERT, R.J. *Listeria monocytogenes* in prepacked ready-to-eat sliced meats. **Public Health Laboratory Service Microbiological Digest**, London, v. 7, p. 56, 1990.

VIGNOLLO, G.M.; SURIANI, F.; HOLGADO, A.P.R.; OLIVER, G. Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 344-349, 1993.

WEHR, H.M. *Listeria monocytogenes* - a current dilemma. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 70, n. 5, p. 769-772, 1987.

WEIS, J.; SEELIGER, H.P.R. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. **Applied Microbiology**, Washington, v. 30, n. 1, p. 29-32, 1975.

YANG, R.; JOHNSON, M.C.; RAY, B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 10, p. 3355-3359, 1992.

YOUSEF, A.E.; LUCHANSKY, J.B.; DEGNAN, A.J.; DOYLE, M.P. Behavior of *Listeria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or Pediocin AcH during storage at 4 or 25°C. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 5, p. 1461-1467, 1991.