

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NISINA EM PRESUNTO COZIDO SOBRE
Listeria monocytogenes E BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS**

DANIELA COMPARSI LARANJA

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia da Silva Malheiros

Porto Alegre

Agosto/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NISINA EM PRESUNTO COZIDO
SOBRE *Listeria monocytogenes* E BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS**

Daniela Comparsi Laranja
Bacharel Farmácia Bioquímica em Tecnologia
de Alimentos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, como um dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente/UFRGS. Área de concentração Microbiologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo
Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia da Silva Malheiros

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil
Agosto/2016

CIP - Catalogação na Publicação

Laranja, Daniela Comparsi
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NISINA EM PRESUNTO
COZIDO SOBRE *Listeria monocytogenes* E BACTÉRIAS ÁCIDO
LÁTICAS / Daniela Comparsi Laranja. -- 2016.
70 f.
Orientador: Eduardo Cesar Tondo.

Coorientadora: Patrícia da Silva Malheiros.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Bactérias ácido
láticas. 3. Presunto cozido. 4. Bacteriocinas. 5.
Nisina. I. Tondo, Eduardo Cesar, orient. II.
Malheiros, Patrícia da Silva, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, quero agradecer a uma pessoa extraordinária pela sua dedicação ao campo da microbiologia de alimentos: o meu orientador Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo, o qual admiro pela sua notável experiência profissional.

Da mesma forma, agradeço a minha co-orientadora Profa. Dra. Patrícia da Silva Malheiros. Não é exagero dizer que sem sua assistência e principalmente paciência, esse trabalho teria sérios problemas para ser completado.

Finalmente, tenho uma grande dívida para com o Prof. Dr. Eliseu Rodrigues por ter aceitado o desafio do projeto nisina HPLC-MS.

As minhas colegas e amigas Elis, Susana, Luana, Mariângela e a “psicóloga” Vera, não só pelos valiosos conselhos, mas também pelos momentos de descontração.

A todos professores, funcionários do ICTA, bolsistas e colegas do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos e do Laboratório de Equipamentos Especiais da UFRGS que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento desse trabalho. Agradeço pelo enorme privilégio de trabalhar e aprender com vocês!

A minha família pelo apoio, principalmente, meu pai Rony pelo exemplo de pesquisador e minha mãe Lidia (*in memoria*) pelos ensinamentos de vida.

E por fim, mas não menos importante, à CAPES, DuPont Brasil e Marsul Montenegro/RS pelo apoio financeiro e/ou tecnológico.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NISINA EM PRESUNTO COZIDO SOBRE *Listeria monocytogenes* E BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

Autor: Daniela Comparsi Laranja

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Eduardo Cesar Tondo

Co-orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Patrícia da Silva Malheiros

RESUMO

O presunto cozido é um dos embutidos cárneos mais consumidos no Brasil, sendo também um dos mais sensíveis à deterioração por bactérias ácido lácticas (BAL) e a contaminação por *Listeria monocytogenes*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana da nisina (Nisaplin®) aplicada em presunto cozido, a fim de controlar *L. monocytogenes* e BAL. Para tanto, presuntos cozidos foram preparados e fatiados individualmente pelas empresas DuPont e Marsul. No ensaio 1, o presunto foi injetado com salmoura contendo 12,5 mg de nisina por kg (dosagem aprovada no Brasil para queijos fundidos). O potencial bioconservante da nisina foi avaliado contaminando artificialmente as fatias do presunto com um *pool* composto por 5 cepas de *L. monocytogenes*. Os resultados do ensaio 1 demonstraram que o tratamento com nisina não teve efeito significativo sobre a população de *L. monocytogenes*. Já as BAL foram inibidas por 2 dias. No ensaio 2, a adição da nisina na mesma dosagem foi feita no tambeamento, inibindo a população de *L. monocytogenes* por 6 dias e BAL por 10 dias. Em vista dos resultados obtidos nos 2 primeiros ensaios foi determinada a concentração mínima bactericida (CMB) do *pool* e dos isolados de *L. monocytogenes*, a fim de verificar a sensibilidade das cepas individualmente e em conjunto e o efeito da nisina sem a matriz cárnea. Além disso, também foi avaliado o efeito sinérgico ou antagônico da salmoura sobre a ação bactericida da nisina. Pôde-se constatar que as diferentes cepas de *L. monocytogenes* demonstraram perfis de sensibilidade diferentes e que o *pool* de cepas foi menos sensível ao efeito da nisina. Os resultados obtidos conduziram a avaliação de dosagem maior de nisina no presunto cozido. No ensaio 3, 32 mg/kg de nisina foram adicionadas a salmoura do presunto cozido e testados contra o *pool* de *L. monocytogenes* e a cepa ATCC 7644, separadamente. Os resultados demonstraram que a nova dosagem de nisina inibiu significativamente a multiplicação do *pool* de *L. monocytogenes* e da cepa ATCC 7644, durante 10 dias, sugerindo ser uma barreira efetiva no controle de *L. monocytogenes* em presunto cozido.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*; bactérias ácido lácticas; presunto cozido; nisina.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (82 p.) Agosto, 2016.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NISIN IN COOKED HAM ON *Listeria monocytogenes* AND BACTERIA LACTIC ACID

Author: Daniela Comparsi Laranja

Advisor: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Co-Advisor: Prof. Dr. Patrícia da Silva Malheiros

ABSTRACT

Precooked ham is one of the most consumed meats in Brazil. It is also one of the most sensitive to spoilage by lactic acid bacteria (LAB) and contamination by *Listeria monocytogenes*. The objective of this study is to evaluate the antimicrobial activity of Nisin (Nisaplin®) when applied to precooked ham, in order to control the growth of *L. monocytogenes* and LAB. For the purposes of this study, the precooked ham prepared and sliced individually by the DuPont and Marsul company was used. For trial 1, brine containing 12.5 mg of nisin was injected per kg of ham (dosage approved in Brazil for processed cheese). The biopreservative potential of nisin was evaluated by artificially contaminating slices of control and test ham with a *pool* of 5 different strains of *L. monocytogenes*. The results of this first trial showed that treatment with this amount of nisin had no significant effect on the growth of the *L. monocytogenes* population. However, the LAB population was indeed inhibited by 2 days. In trial number 2, the addition of nisin to the same amount of precooked ham by tumbling inhibited the growth of the *L. monocytogenes* population by 6 days and of the LAB population by 10 days. In light of the results obtained in these first 2 trials, the minimum bactericidal concentration (MBC) *pool* and *L. monocytogenes* isolates were determined in order to verify the sensitivity of the strains individually and together as well as the effects of nisin without the meat matrix. Additionally, the synergistic or antagonistic effects of brine on the antimicrobial properties of nisin were also evaluated. Results suggest that different strains of *L. monocytogenes* have different sensitivity profiles and that the *pool* of strains was less sensitive to the effects of the nisin. These results prompted an increase in the dosage of nisin added to the precooked ham in trial number 3. In this trial, 32mg/kg of nisin was added to the brine of the precooked ham and tested against the *L. monocytogenes pool* and ATCC 7644 strain, separately. Results demonstrated that this increase in amount of nisin significantly reduced the growth of the *L. monocytogenes pool* and of the ATCC strain for 10 days. This suggests that nisin can be an effective barrier against the growth of *L. monocytogenes* in precooked ham

Keywords: *Listeria monocytogenes*; lactic acid bacteria; cooked ham; nisin.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (82 p.) August, 2016.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	4
3.1.2	<i>Listeria monocytogenes</i> da Indústria de Alimentos	6
3.2	<i>Listeria monocytogenes</i> como Patógeno de Relevância em Produtos Cárneos Prontos para o Consumo	7
3.3	Presunto Cozido: Legislação Brasileira e Inspeção.....	11
3.4	Bactérias Ácido Láticas	13
3.5	Compostos Antimicrobianos.....	15
3.5.1	Bacteriocinas	16
3.5.2	Nisina	18
3.5.2.1	Aplicação da Nisina em Produtos Cárneos	21
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Preparação do Inóculo.....	24
4.2	Fabricação do Presunto	24
4.3	Avaliação da Atividade Antimicrobiana da Nisina em Presunto Cozido	27
4.1.1	Ensaio 1 e 2	27
4.3.1.1	Ensaio 1	27
4.3.1.2	Ensaio 2	28
4.3.2	Ensaio 3	28
4.4	Contaminação Experimental das Fatias de Presunto.....	29
4.5	Contagem de <i>L. monocytogenes</i> e Bactérias Ácido Láticas (BAL) .	29
4.6	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de Nisina	29
4.7	Determinação da nisina por HPLC-DAD-MSn.....	31
4.8	Análise Estatística	31

5.	RESULTADOS	33
5.1	Ensaio 1	33
5.1.1	Atividade da Nisina contra <i>L. monocytogenes</i> em Presunto Cozido, Fatiado, durante o Armazenamento a 8 °C.....	33
5.1.2	Atividade da Nisina contra Bactérias Ácido Láticas em Presunto Cozido, Fatiado, durante o Armazenamento a 8 °C.....	34
5.2	Ensaio 2.....	35
5.2.1	Atividade da nisina contra <i>L. monocytogenes</i> em Presunto Cozido, Fatiado, durante o Armazenamento a 8 °C.....	35
5.2.2	Atividade da Nisina contra Bactérias Ácido Láticas em Presunto Cozido, Fatiado, durante o Armazenamento a 8 °C.....	36
5.3	Concentração Mínima Bactericida - CMB	37
5.3.1	CMB da Nisina sobre Isolados de <i>L. monocytogenes</i> Separadamente e em Combinação	37
5.3.2	CMB de Salmoura contendo Nisina sobre Isolados de <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> Separadamenre e em Combinação	38
5.4	Ensaio 3.....	39
5.4.1	Atividade da Nisina contra <i>L. monocytogenes</i> em presunto Cozido, Fatiado, durante o Armazenamento a 8 °C	39
5.4.2	Atividade da Nisina contra Cepa ATCC 7644 em Presunto Cozido, Fatiado, durante o Armazenamento a 8 °C.....	40
5.5	Comparação entre os Ensaio 2 e 3 das Contagens de <i>L. monocytogenes</i> nas Amostras de Presunto Cozido Fatiado.....	41
5.6	Resultados do HPLC-DAD-MS	43
6.	DISCUSSÃO.....	45
7.	CONCLUSÃO.....	53
8.	REFERÊNCIAS	54

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Surtos de Listeriose Relacionados com Carnes e Produtos Avícolas.....	8
Tabela 2. Padrões Microbiológicos Legais para Presunto.....	11
Tabela 3. Distribuição Isotópica Nisina A.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. A-Estrutura primária da nisina/ B - Estrutura da nisina representada em uma cadeia de 34 amino ácidos com 5 anéis cíclicos	19
Figura 2. Modelo "Sanduíche" de inserção do peptídeo na membrana e formação de poros	20
Figura 3. Fluxograma do processo de fabricação dos presuntos adicionados de nisina	26
Figura 4. A – Tanque agitador NT para homogeneização da salmoura. B- Salmoura pronta para ser injetada na carne (com nisina 12,5 mg/kg)	27
Figura 5 A – Tumbler Güther GPA 90 0,8W utilizado no processo para homogeneização da emulsão cárnea. B- Adição da Nisina diretamente na emulsão cárnea no tambleamento	28
Figura 6. A- Injeção da salmoura no pernil na dosagem final de 32 mg/kg. B - aparência do pernil após a injeção (estrias claras são a salmoura retida nas fibras da carne)	28
Figura 7. Contagem do <i>pool</i> de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/g) em presunto cozido contendo nisina (12,5 mg/kg), armazenado a 8 °C por 40 dias.	33
Figura 8. Contagem das BAL (log UFC/g) naturalmente presentes em presunto cozido, com (12,5 mg/kg), e sem nisina (controle) armazenado a 8 °C por 40 dias.	34
Figura 9. Contagem do <i>pool</i> de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/g) em presunto cozido contendo nisina (12,5 mg/kg), armazenado a 8 °C por 10 dias.	35
Figura 10. Contagens das análises de bactérias ácido lácticas naturalmente presentes nas amostras de presunto cozido durante 10 dias a 8 °C.	36
Figura 11. Perfil de sensibilidade de culturas de <i>L. monocytogenes</i> para nisina (* <i>Pool</i> sem o isolado selvagem de <i>L. monocytogenes</i> 7459).	38
Figura 12. Perfil de sensibilidade de culturas de <i>L. monocytogenes</i> para	38

nisina e Salmoura.

- Figura 13.** Contagem do *pool* de *L. monocytogenes* (log UFC/g) em presunto cozido contendo nisina (32 mg/kg), armazenado a 8 °C por 10 dias. 40
- Figura 14.** Contagens de *L. monocytogenes* ATCC 7644 (log UFC/g) em presunto cozido contendo nisina (32 mg/kg), armazenado a 8° C por 10 dias. 41
- Figura 15.** Contagem do *pool* de *L. monocytogenes* (log UFC/g) em presunto cozido. 42
- Figura 16.** Curva analítica da nisina comercial (Nisaplin®). 43
- Figura 17.** Separação cromatográfica da nisina comercial (Nisaplin®) no espectro 220 nm. 43
- Figura 18.** Identificação por HPLC-MS da nisina (Nisaplin®) 10 dias. 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Percentual
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
AU	<i>Arbitrary Units</i>
BAL	Bactérias Ácido Láticas
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CFR	<i>Code of Federal Regulations</i>
DTA	Doença transmitida por alimentos
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
EU	União Europeia
PFGE	Eletroforese em campo pulsado
USDA	Departamento de Agricultura dos EUA
FSIS	<i>Food Safety and Inspection Service</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
CGPE	Coordenação Geral de Programas Especiais
PNCP	Programa Nacional de Controle de Patógenos
PACPOA	Programa de Avaliação de Conformidade de Padrões Físico-químicos e Microbiológicos de Produtos de Origem Animal Comestíveis e Água de Abastecimento
JECFA	Comitê de Especialistas da FAO/WHO em Aditivos Alimentares
IDA	Alimentares Ingestão Diária Aceitável
MH	<i>Miller Hinton</i>
CMB	Concentração Mínima Bactericida
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
SIF	Serviço de Inspeção Federal
Codex	<i>Committee On Food Additives</i>

FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
ICTA	Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
mL	Mililitro
rpm	Rotações por minuto
RTE	<i>Ready-to-eat</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
USFDA	<i>Food and Drug Administration</i>
UI	Unidades Internacionais
WHO	<i>World Health Organization</i>
YE	<i>Yeast Extract</i>

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda dos consumidores por alimentos cárneos prontos para o consumo (*ready-to-eat-RTE*) desafia a indústria a buscar novas alternativas tecnológicas para estender a vida de prateleira e aumentar a segurança desses alimentos. Dentre essas alternativas tecnológicas está a bioconservação por meio do emprego de microbiota protetora e/ou seus peptídeos antimicrobianos, as bacteriocinas.

A nisina é a mais estudada das bacteriocinas. Ela é sintetizada por algumas cepas de *Lactococcus lactis* e tem ação inibitória contra micro-organismos Gram-positivos, incluindo esporos bacterianos, porém geralmente não é ativa contra bactérias Gram-negativas, leveduras e fungos (Economou *et al.*, 2009). A nisina foi comercializada primeiramente na Inglaterra, em 1953, e desde então seu uso em alimentos foi aprovado em cerca de 50 países (Arauz *et al.*, 2009; Delves-Broughton *et al.*, 1996), inclusive em escala industrial (Cotter; Hill & Ross, 2005). Nos EUA, a nisina é a única bacteriocina reconhecida como GRAS (*Generally Recognized as Safe* – geralmente reconhecido como seguro) pelo FDA/EUA (1988), o qual prevê a livre utilização em queijos fundidos pasteurizados (FDA, 1988). Por ser considerada um produto GRAS, em 2001, o FDA aprovou a utilização da nisina como conservante de carnes de aves e produtos cozidos, em concentrações máximas de 0,025%, no produto final (m/m) (FDA de 2001; US Food And Drug Administration, 2008).

No Brasil, na década de 1990, a nisina foi aprovada pelo Ministério da Saúde, para ser utilizada em preparados à base de queijos fundidos, requeijão e queijo pasteurizado, com dose máxima de 12,5 mg/kg. Em 1998, o Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA) aprovou o uso de 200 mg/kg de nisina, na forma de *spray*, em solução de ácido fosfórico, a ser aplicada no final do processamento térmico em superfícies externas de embutidos, mais especificamente, de salsichas (Brasil, 1998). Entretanto, o uso dessa bacteriocina na formulação de produtos cárneos ainda não é permitido no Brasil, possivelmente porque os estudos sobre o efeito antimicrobiano de nisina nesses produtos não são abundantes e, entre os existentes, os resultados têm sido divergentes. Por exemplo, alguns trabalhos demonstraram que nisina aplicada em produtos cárneos não apresentou efeito inibitório sobre alguns patógenos de origem alimentar, tais como a

Listeria monocytogenes (Sommers *et al.*, 1986; Chung *et al.*, 1989; Bouttefroy *et al.* 2000; Castro, 2002; Luchansky & Call, 2004). Entretanto, pesquisas mais recentes demonstraram (Jofré; Garriga; Aymerich, 2008; Kalschne *et al.*, 2014) que a nisina foi capaz de inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* em produtos cárneos, tornando-os seguros ao consumidor. Da mesma forma, diversos estudos têm demonstrado que a nisina apresentou efeito inibitório sobre bactérias lácticas deteriorantes, evitando perdas econômicas pela indústria de carnes (Calderon *et al.*, 1985; Collins-Thompson *et al.*, 1985; Cutter & Siragusa, 1998; Coventry, *et al.*, 1995; Nattress, *et al.*; Lemay *et al.* 2002; Gill & Holley, 2003; Ercolini *et al.* 2010; Kalschne *et al.*, 2014). Assim, nesses aspectos, a utilização de nisina na formulação de produtos cárneos pode contribuir para o aumento da vida de prateleira, qualidade e segurança de produtos como o presunto cozido, justificando a realização desse estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de nisina aplicada em presunto cozido fatiado sobre *Listeria monocytogenes* e Bactérias Ácido Láticas.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Avaliar a ação antimicrobiana da nisina em presunto cozido artificialmente contaminado com um *pool* de cepas de *L. monocytogenes*, e sobre as bactérias ácido lácticas, naturalmente presentes no presunto cozido, durante o armazenamento (8 °C), utilizando a concentração aprovada para produtos lácteos no Brasil;
- 2.2.2 Analisar a ação antimicrobiana da nisina sobre diferentes etapas do processo de produção do presunto cozido (salmoura e tambeamento);
- 2.2.3 Determinar o perfil de sensibilidade de diferentes cepas de *L. monocytogenes* frente a diversas concentrações de nisina e em salmoura aplicada em presunto.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1.1 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* é atualmente composto por 17 espécies, sendo a *L. monocytogenes* a principal causadora de doença transmitida por alimentos (DTA) em humanos (EFSA, 2014; Casarin *et al.* 2016). A doença causada por esse patógeno denomina-se listeriose, a qual apresenta ocorrência relativamente baixa (2-15 casos por milhão de pessoas por ano), porém alta taxa de letalidade para pessoas imunodeprimidas, idosos, grávidas e seus bebês, com taxa de mortalidade de até 30% dos casos (Sleator *et al.* 2009; Auvolat & Besse 2016). Em 2012, 26 países da União Europeia (UE), notificaram 1.642 casos confirmados de listeriose, um aumento de 10,5% em comparação com 2011. A taxa de notificação da UE foi de 0,41 casos por 100.000 habitantes com as maiores taxas de notificação observadas na Finlândia, Espanha e Dinamarca (1,13, 0,93 e 0,90 casos por 100.000 habitantes), respectivamente (European Food Safety Authority – EFSA e European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC, 2014).

Em média, 91,6% das vítimas de listeriose necessitam de hospitalização. Esta é a maior proporção de casos de hospitalização de todas as zoonoses sob supervisão da UE e reflete o foco da vigilância sobre infecções graves e sistêmicas. Um total de 198 mortes por listeriose foram relatados por 18 países da UE em 2012, sendo o maior número de casos fatais relatados desde 2006. Quinze países relataram um ou mais casos fatais dos quais a França teve o maior número, 63 casos. Outros oito países da UE também demonstraram um aumento nos casos de listeriose, desde o ano 2000 (Roche *et al.*, 2009; Todd & Notermans, 2011). Nos Estados Unidos, foram estimados 1.600 casos de listeriose, 1.500 hospitalizações e 260 mortes anuais (Scallan *et al.*, 2011). Na Suíça, a incidência anual, ao longo dos últimos dez anos, variou de 0,47 a 1,22 casos por 100.000 pessoas. A Suíça teve quatro surtos de listeriose, incluindo o mais recente em 2013/2014 veiculado por salada minimamente processada (Stephan *et al.*, 2015).

As investigações sobre surtos e casos esporádicos de listeriose têm claramente indicado que o consumo de alimentos contaminados é a maneira mais comum de transmissão de *L. monocytogenes* (Adzitey & Huda, 2010; Ramaswamy

et al., 2007; Rocourt, 1996). Dentre os alimentos mais comumente incriminados nos surtos destacam-se aqueles prontos para o consumo, mantidos sob-refrigeração e ingeridos sem aquecimento prévio, tais como leite e produtos lácteos, carne e derivados, vegetais e frutos do mar (Adzitey & Huda, 2010; Farber & Peterkin, 1991; Ramaswamy *et al.*, 2007; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

No Brasil, não há registros de surtos de listeriose por alimentos (Destro, 2006, Brasil 2016), embora *L. monocytogenes* tenha sido encontrada em muitos alimentos, como carne moída (67%), presunto (50%), salsicha (27,6%) (Aragon-Alegro *et al.*, 2008), salmão *in natura* (48%) (Cruz *et al.*, 2008), mortadela (26,7%) (Bersot *et al.*, 2001) e linguiça mista frescal (25%) (Von Laer *et al.*, 2009). A falta de registros de surtos no Brasil pode estar relacionada à complexidade epidemiológica da doença (Hofer *et al.*, 1998, Landgraf *et al.*, 1999, Schwab & Edelweiss, 2003, Hofer, 2006). Gandhi & Chikindas (2007) citam o longo período de incubação (de 3 a 70 dias) da listeriose como fator que dificulta a identificação do patógeno e o rastreamento do alimento contaminado.

Alguns pesquisadores realizaram estudos em relação à prevalência e característica de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de pacientes no Brasil, mas sem estabelecer algum tipo de relação com a via de transmissão do patógeno (Cruz *et al.*, 2008; Mendonça *et al.* 2012). Em 1989, foram diagnosticados no Instituto de Saúde do Distrito Federal (ISDF) três casos de meningite bacteriana associadas a *L. monocytogenes*. Os pacientes foram um recém-nascido, uma criança e um adulto, sendo que este último resultou em óbito (Cruz *et al.*, 2008, Hofer *et al.*, 1998). No Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), durante o ano de 2000, foram realizadas coletas de dez placentas provenientes de abortos ou partos prematuros. A partir de análise microscópica e avaliação imunohistoquímica foi observado que 50% das amostras analisadas foram positivas para *L. monocytogenes*. Estes resultados demonstraram que *L. monocytogenes* é uma importante causa de doença no Brasil, entretanto, pouca importância é dada em relação à sua investigação e seu diagnóstico (Cruz *et al.*, 2008; Schwab & Edelweiss, 2003).

A ocorrência de casos de listeriose depende de vários fatores, como nível de contaminação dos produtos alimentícios, tipo de alimento, imunidade do hospedeiro e potencial de virulência das cepas (Handa-Miya *et al.*, 2007; Werbrouck *et al.*, 2006; Werbrouck *et al.*, 2008; World Health Organization -WHO, 2004). Por esta razão, a qualidade e a segurança dos alimentos fornecidos pelas indústrias são

de fundamental importância, uma vez que fornecem alimentos para vários segmentos da população.

3.1.2 *Listeria monocytogenes* na indústria de alimentos

Certas cepas de *L. monocytogenes* podem se estabelecer e permanecer em uma linha de processamento de alimentos como membros da flora microbiana residente por meses ou anos e, assim, contaminar produtos (Tompkin 2002; Gandhi & Chikindas, 2007; Carpentier & Cerf, 2011).

Senczek *et al.* (2000) pesquisaram a persistência de cepas de *L. monocytogenes* em unidades de processamento de carnes. Através de eletroforese em campo pulsado (PFGE), foi possível verificar que algumas cepas persistiram no mesmo ambiente de processamento durante dois anos, indicando que foram capazes de adaptar-se aquele ambiente. Além disso, as mesmas cepas encontradas nos produtos cárneos foram identificadas no ambiente de processamento, indicando contaminação cruzada.

L. monocytogenes entra principalmente na cadeia de produção de alimentos por contaminação cruzada das superfícies e do material, tornando este agente patogênico uma ameaça para a indústria alimentar e os consumidores (Autio *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2006; Papadopoulou *et al.* 2012)

A contaminação de produtos alimentares pode ocorrer também por biofilmes em equipamentos. Sua formação é favorecida pela acumulação de resíduos alimentares, organismos de deterioração e agentes patogênicos de origem alimentar (Donlan, 2002). Biofilmes são comumente definidos como comunidades de micro-organismos ligados a uma superfície ou interface que produzem uma matriz extracelular (Costerton *et al.*, 1995).

Em alimentos cozidos prontos para consumo (ready-to-eat - RTE), a baixa incidência de micro-organismos competidores e a longa vida de prateleira favorecem a multiplicação de *L. monocytogenes*, em vista disso, a contaminação pós-processamento aumenta o risco ao consumidor (Suihko *et al.*, 2002; Keskinen *et al.*, 2008). Esses fatores justificam a importância de buscar produtos que aumentem a segurança dos produtos cárneos prontos para consumo.

3.2 *Listeria monocytogenes* como Patógeno de Relevância em Produtos Cárneos Prontos para o Consumo (ready-to-eat - RTE)

Produtos RTE são definidos como produtos à base de carnes os quais podem ser consumidos sem a necessidade de preparação adicional para alcançar a segurança do alimento, mas que podem receber tratamento para fins culinários de palatabilidade, estético ou gastronômico (CFR, 2016). No Brasil, o MAPA refere-se como produtos de origem animal prontos para o consumo os seguintes alimentos em geral: queijos, salsichas, peixes defumados, presuntos, mortadelas, salsichão, lombo cozido e defumado, camarão cozido, bastonetes de Surumi, filé de salmão defumado, molusco cozido, apresuntado e fiambre (MAPA 2015).

Estes tipos de produtos são muito populares, devido à conveniência, a variedade e palatabilidade. Em geral, os produtos RTE são processados termicamente nas temperaturas entre 65 e 75 °C. Eles diferem dos produtos processados com elevadas temperaturas de esterilidade ou letalidade total de micro-organismos, como por exemplo, carnes enlatadas. Assim, com exceção de determinados produtos fermentados, secos ou semi-secos e ácidos, alimentos de origem animal RTE geralmente necessitam de refrigeração para manter sua qualidade e segurança (FSIS 2012)

Entretanto, é importante destacar que alguns micro-organismos podem não somente sobreviver como também multiplicar-se em alimentos RTE refrigerados, como *L. monocytogenes*. Além disso, existe o risco de contaminações por esse patógeno mesmo que tenham todos os cuidados necessários e um sistema de Análise de Perigo e Ponto Crítico de Controle (APPCC) (Mellefont & Ross 2007). Visto que, trata-se de uma bactéria ambiental, psicrotrófica e que pode formar biofilmes. Nos Estados Unidos e em países da Europa, *L. monocytogenes* foi identificada como o agente patogênico predominante em carnes RTE (Gormley *et al*, 2010a, 2010b; Cabedo *et al*, 2008).

Surtos de listeriose foram documentados em todo o mundo (Tabela 1). e estes tem sido atribuídos aos produtos cárneos RTE, tais como patês, geleias de língua de porco, rillettes, salsichas e fatiados de frango e peru. A Tabela 1 apresenta um levantamento de surtos de listeriose relacionados com produtos cárneos RTE (*Public Health Agency of Canada*, 2009d e 2010).

Tabela 1. Surtos de listeriose relacionados com carnes RTE.

Ano	Localização	Invasiva/ Não invasiva	Número de casos (Óbitos)	Alimento	Referências
1987-1989	Reino Unido e Irlanda	Invasiva	355 (94)	Patê	McLauchlin <i>et al.</i> , 1991; Farber and Peterkin, 2000
1990	Austrália	Invasiva	11(6)	Patê	Watson and Ott, 1990; Kittson, 1992
1992	França	Invasiva	279 (85)	Geleia de língua de porco	Goulet <i>et al.</i> , 1993; Jacquet <i>et al.</i> , 1995; Salvat <i>et al.</i> , 1995
1993	França	Invasiva	39 (12)	Rillettes de porco (Carne RTE parecida com patê)	Goulet, 1995; Goulet <i>et al.</i> , 1998
1998-1999	U.S.A.	Invasiva	108 (14)	Salsichas de carne	Anonymous, 1998; Anonymous, 1999; Mead <i>et al.</i> , 2006
1999	U.S.A.	Invasiva	11	Patê	Norton and Braden, 2007
1999-2000	França	Invasiva	10 (3)	Rillettes	de Valk <i>et al.</i> , 2001; Swaminathan <i>et al.</i> , 2007
1999-2000	França	Invasiva	32 (10)	Geleia de língua de porco	Dorozynski, 2000; de Valk <i>et al.</i> , 2001; Swaminathan <i>et al.</i> , 2007
2000	U.S.A.	Invasiva	30 (7)	Fatias de carne de peru	Hurd <i>et al.</i> , 2000; Olsen <i>et al.</i> , 2005
2000	Austrália		31	Carne RTE e Presunto em lata	Sim <i>et al.</i> , 2002
2001	U.S.A.	Não invasiva	16	Peru fatiado pré-cozido	Frye <i>et al.</i> , 2002
2002	U.S.A.	Invasiva	54 (8)	Fatias de carne de peru	Anonymous, 2002; Gottlieb <i>et al.</i> , 2006
2008	Canada	Invasiva	57 (23)	RTE deli-carne	PHAC, 2009d; PHAC, 2010

Fonte: Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate, Health Products and Food Branch 2011.

Gombas *et al.* (2003) observaram que a prevalência de *L. monocytogenes* nos produtos cárneos fatiados nos mercados de fracionamento (supermercados) foi maior que em produtos cárneos fatiados pelas indústrias. Entretanto, a concentração de *L. monocytogenes* nas amostras de produtos cárneos fatiados e embalados na indústria foi maior do que a encontrada nos produtos manipulados nos próprios estabelecimentos de venda (supermercados e delicatesses). Estes resultados se justificam devido a maior vida de prateleira dos produtos cárneos fatiados pelas indústrias, os quais permite que *L. monocytogenes*, quando presente, alcance populações maiores.

Segundo Todd e Notermans (2011), dos surtos de listeriose ocorridos nos EUA entre 2005 e 2008 e atribuídos a produtos cárneos, 83% estavam associados a produtos cárneos fatiados no ponto de venda, e 17% a produtos cárneos fatiados na indústria, entre estes produtos não tiveram diferenças na prevalência de *L. monocytogenes*. No entanto, foi observado um número menor de casos de listeriose causada por produtos cárneos que apresentavam em sua formulação algum conservante do que naqueles que não apresentavam inibidor.

Martins e Germano (2010) relataram a ocorrência de *L. monocytogenes* em 130 amostras de presunto suíno cozido e 130 amostras de salame fatiado embalado a vácuo pelo próprio fabricante, comprados na cidade de São Paulo, encontrando *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em 1,5% e 0,8% das amostras de presunto, respectivamente. Os autores atribuíram esta baixa ocorrência à eficiência do processamento térmico e adoção de Boas Práticas durante o fatiamento. Em amostras de salame, a incidência de *Listeria* spp. e de *L. monocytogenes* foi mais alta, 24,6% e 6,2%, respectivamente. Considerando que estes produtos são processados, os autores concluíram que a contaminação detectada foi consequência do fatiamento pós-processamento.

No ano de 2011 foi reportado na Suíça um surto de listeriose causado pelo consumo de presunto cozido contaminado com *L. monocytogenes*. Foram seis casos confirmados e três suspeitos. Duas amostras de presunto testadas continham 470 e 4800 unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) de *L. monocytogenes*, respectivamente. As investigações mostraram que o presunto não foi contaminado na planta de produção, mas nas instalações de uma

empresa para a qual o corte e a embalagem foi terceirizada (Bille *et al.*, 2006; Bula, Bille, & Glauser, 1995; Haechler *et al.*, 2013).

Devido à elevada taxa de mortalidade (20 a 30%) associada com a listeriose, há uma tolerância zero de *L. monocytogenes* em produtos cárneos RTE nos Estados Unidos (Code of Federal Regulations -CFR regra 9 Part 430). Desde 1983, o Departamento de Agricultura dos EUA (USDA), através do Serviço de Inspeção e Segurança dos Alimentos (*Food Safety and Inspection Service - FSIS*), tem realizado testes microbiológicos regulares em carnes RTE para garantir a segurança dos produtos (FSIS, 2012). Para minimizar o risco de contaminação por *L. monocytogenes*, em 2003, o FSIS estabeleceu uma regra sobre como controlar esse patógeno em carnes e produtos avícolas RTE. Com a finalidade de cumprir este regulamento, os processadores de alimentos teriam três alternativas:

Alternativa 1, o estabelecimento aplica dois tratamentos bactericidas, sendo um durante o processo de produção e outro no produto final ou na sua embalagem selada. Por exemplo: cocção e irradiação do produto embalado. Além desses processos, o estabelecimento deve usar um agente antimicrobiano para reduzir ou eliminar *L. monocytogenes* ou um processo adicional que tenha a função de suprimir ou limitar a multiplicação de um micro-organismo. Por exemplo, a utilização de congelamento, fermentação e/ou secagem.

Alternativa 2, o estabelecimento aplica dois tratamentos bactericidas (durante e após processamento) ou mais de um processo adicional.

Alternativa 3, o estabelecimento estabelece rigorosas medidas de sanitização e Boas Práticas de Fabricação para controlar *L. monocytogenes*.

Alternativas 1 e 2 envolvem a utilização de um ou mais aditivos antimicrobianos, e seus níveis permissíveis de aplicação devem ser validados quanto à sua eficácia em inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* de 1 a 2 logaritmos durante a vida de prateleira do produto (FSIS 2014).

O controle de segurança da carne RTE envolve outras ações regulatórias. Em 2011, o FSIS publicou diretrizes de processamento detalhados para ajudar os processadores de carne a atingirem o controle adequado de produtos RTE cozidos, antes do armazenamento (FSIS, 2012). As diretrizes listam vários produtos específicos e combinações de tempo e temperatura para eliminar a *L. monocytogenes* e outros agentes patogênicos, incluindo *Salmonella*,

Escherichia coli O157:H7, *Campylobacter* spp., *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens*. Para ajudar os processadores, o FSIS também desenvolveu programas modelo de fácil acesso para minimizar ameaças de patógenos. Esforços têm sido realizados na indústria de alimentos no desenvolvimento de tecnologias de barreira para minimizar a contaminação pós-letalidade e multiplicação de patógenos em produtos RTE (FSIS 2014).

3.3 Presunto: Legislação Brasileira e Inspeção

Presuntos são definidos no Brasil, segundo a Instrução Normativa nº 20 de julho de 2000 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2000) como “produto cárneo industrializado obtido dos cortes do membro posterior do suíno, desossado ou não, e submetido ao processo térmico adequado. Quando o membro posterior utilizado não for de suíno, o produto será denominado de presunto, seguido do nome da espécie animal de procedência”.

A microbiota de presuntos cozidos é composta basicamente de microorganismos Gram-positivos, como *Micrococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leucoostoc* e também leveduras, mas tem sido relatada a presença de diferentes tipos de patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e outros (Barbuti & Parolari, 2002).

Os padrões microbiológicos para alimentos, estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 12 de 02 de janeiro de 2001, estabelecidos para o produto presunto são apresentados na Tabela 1 (Brasil 2001)

Tabela 2. Padrões microbiológicos legais para presunto

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

Fonte: RDC nº 12 ANVISA de 02/01/2001

Na RDC nº 12/2001, para o produto presunto, não é contemplado limite específico para *L. monocytogenes*. Entretanto, é importante destacar que essa legislação está sendo revisada e novos padrões devem ser definidos.

Em função dos riscos inerentes a *L. monocytogenes* em alimentos de origem animal prontos para o consumo, o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), por meio da Coordenação Geral de Programas Especiais (CGPE), implantou a partir de 2013, o Programa Nacional de Controle de Patógenos (PNCP) e o Programa de Avaliação de Conformidade de Padrões Físico-químicos e Microbiológicos de Produtos de Origem Animal Comestíveis e Água de Abastecimento (PACPOA). O PNCP foi desenvolvido visando identificar a prevalência dos patógenos de importância em saúde pública em produtos de origem animal sob inspeção federal, avaliar os controles de processo adotados pelos estabelecimentos e gerenciar o risco, a fim de preservar a segurança dos alimentos. No ano de 2014, esse programa abrangeu os seguintes micro-organismos: *L. monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo, *Escherichia coli* verotoxigênica em carne bovina, *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e *Salmonella* spp. em carcaças de suínos.

O Programa de controle de *L. monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para consumo foi instituído por meio da Instrução Normativa nº 9, de 08 de abril de 2009. A primeira etapa deste programa ocorreu entre dezembro de 2009 e dezembro de 2010, a segunda etapa foi executada entre janeiro e dezembro de 2011 e a terceira etapa entre agosto de 2013 e dezembro de 2014. Em todas essas etapas, o presunto foi testado.

No período entre agosto/2013 e dezembro/2014 o programa analisou 291 amostras de produtos cárneos, sendo que 6,87% estavam contaminadas por *L. monocytogenes* (Brasil, 2015), mostrando que o patógeno está presente nesses alimentos embora surtos ainda não tenham sido relatados no Brasil.

A instrução normativa nº 9 (MAPA 2009) instituiu os procedimentos de controle da *L. monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo. A Norma tem como objetivo monitorar e assegurar a inocuidade destes produtos em relação a este patógeno e aplica-se aos estabelecimentos que fabricam produtos de origem animal, prontos para o consumo, que apresentem as seguintes características físico-químicas: pH > 4,4, atividade de água > 0,92 ou

concentração de cloreto de sódio < 10 %, respeitadas as características de seus processos de produção. Os resultados positivos para *L. monocytogenes* desencadearão os procedimentos de inspeção do processo de produção e a revisão dos registros dos produtos de origem animal prontos para o consumo (Brasil, 2015).

Nesse sentido, em 25 de janeiro de 2013, por meio da Portaria SDA nº 17/2013, foi criada a Comissão Científica Consultiva em Microbiologia de Produtos de Origem Animal que possibilita a soma de esforços entre governo e academia para avançar na gestão microbiológica do sistema de inspeção brasileiro.

Os Programas Nacionais de Controle de Patógenos - PNCP permitem identificar a prevalência dos patógenos em produtos de origem animal produzidos pelos estabelecimentos brasileiros registrados junto ao SIF. Com isso, é possível ao DIPOA identificar e estabelecer medidas de controle para o perigo, implementar essas medidas de controle e monitorar os resultados obtidos, a fim de garantir a segurança dos alimentos ao consumidor frente a esses patógenos (Brasil, 2015).

3.4 Bactérias Ácido Láticas (LAB)

As LAB são um grupo de bactérias Gram-positiva, não esporuladas, anaeróbias facultativas, que produzem ácido lático como um dos principais produtos do metabolismo da fermentação de hidratos de carbono (Hayek & Ibrahim, 2013). Quatro gêneros foram reconhecidos como LAB: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, e *Streptococcus*. Métodos de biologia molecular têm aumentado o número de gêneros incluídos neste grupo (Von Wright & Axelsson, 2012). A atual classificação taxonômica inclui o grupo LAB no filo *Firmicutes*, classe *Bacillis*, e a ordem *Lactobacillales* (Quinto *et al.*, 2014)

LAB constituem um grupo que tem sido muito associado com carne fresca e cozida, podendo tanto contribuir beneficentemente pela ação de agentes bioprotetores quanto gerar metabólitos causadores de características sensoriais e organolépticas indesejáveis, ou seja, deterioração do produto (Huis in 't Veld, 1996; Labadie, 1999, Chaillou *et al.*, 2014; Fall *et al.*, 2012; Vasilopoulos *et al.*, 2010).

Entende-se por produto deteriorado aquele que apresenta alterações físicas, químicas e/ou organolépticas, em decorrência da ação de micro-organismos e/ou por reações químicas, enzimáticas e/ou físicas (Brasil, 2001).

Um alimento deteriorado não é, necessariamente, um perigo ao consumidor, visto que os micro-organismos deteriorantes de um modo geral não são patogênicos. Entretanto, devido às perdas econômicas, desgaste da marca ocasionada pela queda na confiança do consumidor e perda de produtos, buscam-se mecanismos para minimizar a deterioração (Nychas et al., 2008).

A microbiota da carne é originária, inicialmente, das instalações dos animais e do matadouro. Além disso, os micro-organismos podem também derivar do ambiente de processamento, transporte, distribuição (Nychas & Koutsoumanis, 2008) e das condições inadequadas de higiene dos manipuladores (Nielsen et al., 2008; Sofos & Geornaras, 2010). A deterioração da carne é geralmente causada por bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Shewanella putrefaciens*) e Gram-positivas (LAB, *Brochotrix thermosfacta*, clostrídios) (Casaburi et al., 2015; Doulgeraki et al., 2012; Nychas et al., 2008).

Os produtos cárneos são muito propensos a deterioração microbiana, pois possuem uma matriz de nutrientes que pode favorecer a multiplicação de diversos micro-organismos, além de ter elevada aw (0,85 - 0,98) e pH \approx 7 (Dave & Ghaly 2011).

As alterações nos produtos cárneos e os micro-organismos predominantes nestes alimentos variam de acordo com o tipo de produto e as condições de embalagem e armazenamento. Por exemplo, produtos cárneos mantidos em condições aeróbias poderão sofrer rancificação e alteração na cor e no sabor, devido à predominância de *Pseudomonas* spp. enquanto em condições anaeróbias os micro-organismos predominantes são *Lactobacillus* spp. e *Brochotrix thermosfacta*, responsáveis por aumentar a acidez do alimento (Doulgeraki et al., 2012; Nychas et al., 2008).

Segundo Mataragas et al., (2006), dentre os principais micro-organismos deteriorantes de produtos cárneos RTE estão as LAB. Kalschne et al., (2014) descreve em seu trabalho as LAB como organismos de deterioração no presunto cozido embalado a vácuo.

O processo de cocção utilizado na elaboração de presunto cozido elimina a maioria dos micro-organismos que estejam na forma vegetativa, porém

pode ocorrer recontaminação na etapa de fatiamento e embalagem. Em vista disso, o uso de compostos antimicrobianos aliados a determinados produtos químicos ou tecnologias de intervenção são essenciais para proteger os produtos cárneos pós-processamento.

3.5 Compostos Antimicrobianos

Os ingredientes antimicrobianos são compostos que possuem a capacidade de inibir ou inativar os micro-organismos (Davidson, 1997) que contaminam os alimentos. Esses compostos podem ser utilizados na produção de embalagens que entram em contato com o alimento, ser aplicados na superfície dos mesmos ou serem utilizados como parte das matérias-primas utilizadas na produção do alimento (Frazier & Westhoff, 1993; Sung *et al.* 2013)

Diversos ingredientes têm sido utilizados para controle microbiológico de alimentos com destaque para os ingredientes antimicrobianos químicos. Os antimicrobianos químicos mais usados são o ácido benzóico, benzoato de sódio, propionato de cálcio ou sódio e ácido sórbico. O cloreto de sódio (sal de cozinha) é o mais antigo agente antimicrobiano. (Cuppert, 1994; Arora & Kaur, 1999; Seman *et al.* 2002; Byelashov *et al.* 2010; Ingham *et al.* 2010).

Os agentes antimicrobianos são usados em vários alimentos. Ácidos orgânicos (acético, benzóico, propanóico e sórbico) são usados como agentes antimicrobianos em alimentos com baixo pH. Dióxido de enxofre e sulfitos são usados para controlar a multiplicação de micro-organismos em frutas secas, sucos e vinhos. Nitratos e nitritos são utilizados para inibir a multiplicação de *Clostridium botulinum* em alimentos que contenham carne crua (linguiça, presunto, bacon e salame) (Davidson *et al.* 2005).

A maioria dos antimicrobianos utilizados em alimentos apresenta ação bacteriostática e não bactericida. Desta forma, a vida útil dos produtos é prolongada, mas não de forma indefinida, uma vez que os micro-organismos ainda presentes continuam promovendo modificações no alimento (Davidson, 1997).

A descoberta de que as nitrosaminas carcinogênicas são formadas a partir de nitritos utilizados como agentes de cura em carnes desencadeou uma procura por substitutos de nitrito (Montville & Winkowski, 1997), uma vez que a

crescente demanda de consumidores conscientes deste fato requerem não só praticidade e qualidade, mas também alimentos minimamente processados, que apresentem características de sabor e aroma próximas do produto fresco, preparados sem a adição de conservantes químicos, com baixo teor de cloreto de sódio, mas ainda com longa vida útil. Outro fator que impulsiona a descoberta de novas substâncias antimicrobianas é o desenvolvimento progressivo de resistência por micro-organismos patogênicos a antibióticos e conservantes químicos convencionais (Kim & Wijesekara, 2010).

Para que as exigências de mercado sejam atendidas, pesquisas sobre a utilização de agentes antimicrobianos naturais em alimentos vêm crescendo constantemente. Um dos frequentes alvos dessas pesquisas são as bacteriocinas, objetivando substituir e/ou diminuir as dosagens dos conservantes químicos nos alimentos e buscando o controle de bactérias patogênicas ou deteriorantes.

3.5.1 Bacteriocinas

Bacteriocinas são substâncias antimicrobianas de natureza protéica, sintetizadas ribossomicamente, que apresentam ausência de letalidade para a célula produtora (Montville & Kaiser, 1993; Jack *et al.*, 1995; Cotter *et al.*, 2005). Tais peptídeos têm sido encontrados em muitos grupos de bactérias e, dentro das espécies, dezenas ou mesmo centenas de tipos de bacteriocinas são produzidas (Klaenhammer, 1993; Zouhir *et al.*, 2010). As diferentes bacteriocinas apresentam variações no espectro de atividade, modo de ação, massa molecular, origem genética e propriedades bioquímicas (Diep e Nes, 2002).

As bacteriocinas podem ser bactericidas ou bacteriostáticas. Para que o efeito bactericida ocorra, o micro-organismo alvo deve apresentar sensibilidade ao antimicrobiano que, mesmo em baixas concentrações, é capaz de provocar a morte celular rapidamente. A maioria das bacteriocinas age formando canais na membrana ou poros transversalmente à bicamada fosfolipídica, o que provoca a saída de pequenos compostos ou a alteração da força protomotriz necessária para a produção de energia e para a síntese de proteínas ou ácidos nucléicos (Montville & Chen, 1998; Oscáriz & Pisabarro, 2001). Para formar os poros, as bacteriocinas precisam interagir com a membrana citoplasmática da célula-alvo. A

primeira fase na formação de poros pela bacteriocina envolve as interações eletrostáticas entre a carga positiva e os resíduos polares da bacteriocina com os fosfolípidios aniônicos presentes na bicamada lipídica da membrana alvo (Abee *et al.*, 1995). A segunda envolve mudanças irreversíveis e letais em cepas sensíveis à bacteriocina (Desmazeaud, 1997).

Nos últimos anos, diversas pesquisas relacionadas a utilização de bacteriocinas como bioconservantes foram conduzidas, indicando que sua aplicação em alimentos pode trazer uma série de benefícios, tais como extensão da vida-de-prateleira, proteção extra durante condições de abuso de temperatura, diminuição do risco de transmissão de micro-organismos patogênicos na cadeia de alimentos, redução da necessidade de aplicação de conservantes químicos e possibilidade de uso de tratamentos térmicos mais brandos (Gálvez *et al.* 2007).

Além disso, as bacteriocinas de BAL oferecem uma série de propriedades desejáveis que as tornam adequadas para o uso como conservantes de alimentos: são produzidas por bactérias GRAS (Generally Recognized as Safe – geralmente reconhecido como seguro), não são tóxicas frente às células eucarióticas, são inativadas por enzimas digestivas, tendo pequena influência na microbiota intestinal; são normalmente tolerantes a ampla faixa de pH e temperatura; podem ter amplo espectro de ação, inibindo tanto bactérias patogênicas quanto deteriorantes e; genes estão codificados em plasmídeo, facilitando a manipulação genética (Thomas *et al.* 2000 apud. Gálvez *et al.* 2007).

A funcionalidade das bacteriocinas dependem de alguns fatores, como por exemplo, a resistência ao tratamento térmico. O processamento térmico de alimentos pode causar perda de atividade das bacteriocinas. As propriedades químicas dos alimentos, como pH e teor de gordura, também podem influenciar significativamente na escolha de determinada bacteriocina para ser utilizada em um alimento específico (Deegan *et al.* 2006).

Vários autores ressaltam que os resultados obtidos em laboratório nem sempre são reproduzidos quando as bacteriocinas são aplicadas em alimentos. A atividade antimicrobiana verificada *in vitro* contra determinadas espécies de micro-organismos não leva em conta a microbiota presente no produto onde estas bacteriocinas serão aplicadas, ignorando interações possíveis. Nos testes em laboratório, a possível ligação das bacteriocinas com componentes dos alimentos,

a permanência das bacteriocinas adsorvidas à superfície das bactérias produtoras, o efeito do pH na liberação e na atividade das bacteriocinas, a atividade de proteases, são alguns fatores que nem sempre são considerados. Além disso, as bacteriocinas podem ser adversamente afetadas pelas condições de processamento e estocagem como pH e temperatura de processamento e armazenagem do produto (Devlighere *et al.*, 2004; De Martinis *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2008).

3.5.2 Nisina

Nisina é a bacteriocina comercial mais utilizada como bioconservante em muitos países (Cotter *et al.*, 2005). Essa bacteriocina foi considerada de uso seguro para aplicação em alimentos pelo *Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization* (FAO/WHO), em 1969, e tem recebido muita atenção devido a seu amplo espectro inibitório contra bactérias Gram-positivas como *Listeria* e *Staphylococcus*, bem como a inibição efetiva de esporos de espécies de *Bacillus* e *Clostridium* (Arauz *et al.*, 2009).

A nisina é produzida através da fermentação por algumas cepas de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, um micro-organismo GRAS. É um peptídeo policíclico com 34 resíduos de aminoácidos (massa molecular de 3354 Da), que contém aminoácidos lantionina, methilantionina, dideidroalanine e ácido dideidroaminobutirico. Além disso, a nisina é abundante em lisina, histidina, valina, leucina e isoleucina e é desprovida de aminoácidos carregados negativamente (Figura 1).

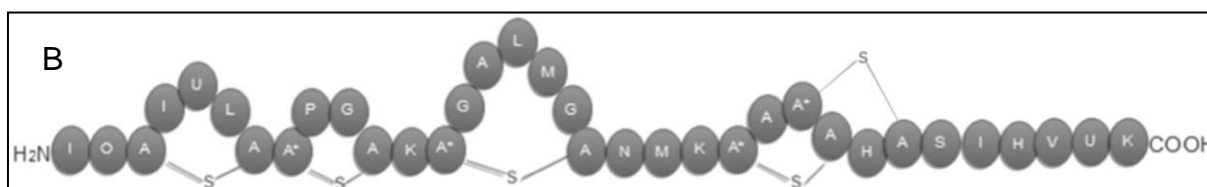
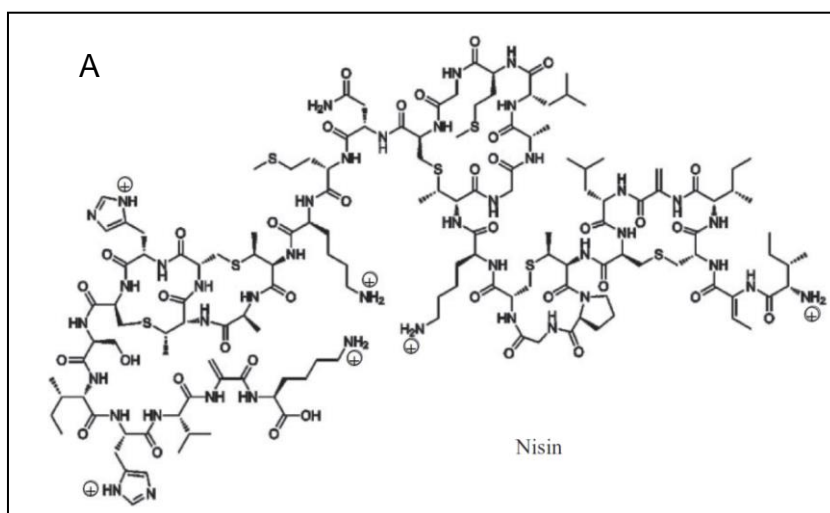


Figura 1. A- Estrutura primária da nisina. Adaptado de Jiang Jiang & Youling L. Xiong (2015). B - Estrutura da nisina representada em uma cadeia de 34 amino ácidos com 5 anéis cíclicos. (Adaptado de Khan, I., & Oh, D.-H. 2016).

Esta estrutura única fornece a nisina uma afinidade elevada para com a membrana celular. A atividade antibacteriana da nisina é atribuída à sua interação com fosfolípidios aniônicos na parede celular bacteriana, resultando na destruição da função da membrana e a fuga de componentes celulares (Breukink *et al*, 1997; Juneja, 2012) (Figura 2). A atividade antimicrobiana da nisina pela interação do peptídeo com a membrana celular bacteriana por meio do acúmulo de peptídeos na superfície desta, forçando a inserção da nisina no interior; e por meio de uma ancoragem do peptídeo com o lipídio II, componente precursor da parede de peptideoglicano (Breukink & De Kruijff, 2006). Acredita-se que o processo de inserção na membrana siga o modelo “sanduíche”, no qual os peptídeos se inserem causando uma curvatura da membrana, fazendo que o sítio hidrofílico do peptídeo interaja com a cabeça polar do fosfolipídio e, paralelamente, o sítio hidrofóbico interaja com a cauda (Brogden, 2005).

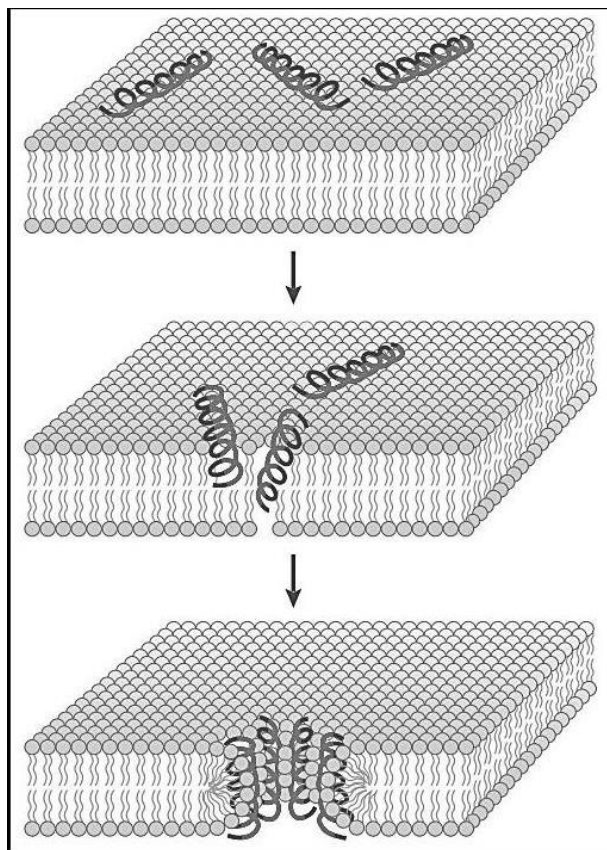


Figura 2. Modelo "Sanduíche" de inserção do peptídeo na membrana e formação de poros. Adaptado de Brogden (2005).

Através do mecanismo dependente de lipídio II, a porção N-terminal da nisina forma, junto com este glicopeptídeo, uma ligação estável na região pirofosfato preso ao açúcar MurNAc (ácido N-acetilmurâmico) (Breukink & De Kruijff, 2006). A estabilidade é tal que a presença da nisina prejudica o transporte de MurNAc e GlcNAc (N-acetilglucosamina) para a matriz da parede celular (Wiedemann *et al.*, 2001). Esta ligação, a porção C-terminal da nisina auxilia na formação de um complexo de várias moléculas de nisina e lipídio II, formando um poro que, posteriormente, levará a célula a um desequilíbrio eletrostático e, conseqüentemente, à morte celular (Breukink & De Kruijff, 2006). Mesmo sendo essencial para a atividade antimicrobiana, a formação de poros não é o único mecanismo de atividade antimicrobiana dependente de lipídio II. Estudos mostraram uma atividade quantitativamente similar da mutacina 1140, peptídeo que também faz ligação estável com o lipídio II, porém não é capaz de formar poros na membrana (Smith *et al.*, 2008), mostrando que deve existir outro

mecanismo mediado pela ligação entre nisina e lipídio II (Breukink & De Kruijff, 2006).

Em vista disso, o mecanismo de atuação antimicrobiana da nisina frente a micro-organismos e mais especificamente a *L. monocytogenes* ainda não está completamente elucidado. Estudos sobre o efeito antimicrobiano da nisina contra *L. monocytogenes* em produtos cárneos apresentam diferentes resultados, contudo, sabe-se que esse peptídeo é eficaz contra muitas bactérias Gram-positivas, incluindo *L. monocytogenes* (Chung *et al.*, 1989; Bouttefroy *et al.* 2000; Castro, 2002; Luchansky & Call, 2004; Zhang & Mustapha, 1999; Davies *et al.*, 1999; Ariyapitipun *et al.*, 2000; Ofré *et al.* 2008; Kalschne *et al.*, 2014). Por essa razão a nisina é particularmente interessante para melhorar a segurança das carnes RTE (Martin-Visscher *et al.* 2011).

3.5.2.1 Aplicação da Nisina em Produtos Cárneos

Em 1968, na 12ª Comitê de Especialistas do FAO/WHO, a Organização de Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) avaliou a toxicidade da nisina com base em estudos com animais. A partir dessa avaliação, foi estabelecida a Ingestão Diária Aceitável - IDA (*Acceptable Daily Intake*) que determina a quantidade máxima do aditivo que pode ser ingerida diariamente, sem causar quaisquer danos à saúde do consumidor. Essa quantidade foi de 33000 Unidades Internacionais (UI) (0,825 mg) por quilo de peso corpóreo (*Codex Committee On Food Additives Session 45* 2013). Atualmente, a IDA estabelecida pelo JECFA é de 0-2 mg/kg de peso corporal, com base em um NOAEL de 224,7 mg de nisina por quilograma de peso corporal (FAO/WHO 2013).

A UE estabeleceu a IDA de 0,13 mg/kg de peso corporal/dia (*Codex Circular Letter* 2012). Essa discrepância de valores fez com que a questão fosse levantada pela UE e a pedido desta, a nisina foi marcada para ser re-avaliada pela assembleia JECFA 77 (*Codex Committee On Food Additives Session 45*, 2013).

Estudos toxicológicos realizados com a nisina demonstraram que a sua ingestão não causa efeitos tóxicos ao organismo humano nas doses em que a população é exposta, sendo reportada uma DL50 de 6950 mg/kg de peso

corpóreo, similar ao consumo de sal. Quando administrada oralmente, é rapidamente inativada pela quimi tripsina, enzima produzida no pâncreas e liberada no intestino delgado, e é sensível à ptialina, não sendo detectada na saliva de humanos após 10 minutos do consumo de líquidos contendo essa bacteriocina. É também a única bacteriocina que foi confirmada como GRAS “Generally Regarded as Safe” e de uso liberado como aditivo alimentar pelo comitê do *Codex Alimentarius*, da FAO, para uso como agente antimicrobiano na inibição do desenvolvimento pós-germinativo de esporos e formação de toxina por *C. botulinum* em queijos fundidos e pasteurizados (Chandrapati & O’Sullivan, 1998). A nisina é aplicada a produtos de carne em preparações comerciais que normalmente consistem de 2,5% (m/m) nisina. O nível de utilização é geralmente de 5 - 25 mg/kg como nisina pura (*Codex Committee On Food Additives Session 45 2013*). O CCFA47 estabeleceu um grupo de trabalho eletrônico que recomenda que CCFA48 discuta o atual projeto de disposição proposto para a nisina para o uso na categoria de alimentos 08.3.2 (carne triturada processada termicamente, aves e produtos de caça) na dosagem de 25 mg/kg (*Codex Committee on Food Additives Session 48 2016*)

A legislação brasileira (DINAL/MS Portaria nº6, 1990; DETEN/MS Portaria nº34/1992 e portaria nº29/1996) permite o uso de nisina na dose de 12,5 mg/kg em queijos fundidos, requeijões e queijos pasteurizados (Brasil, 1996). A aplicação de uma solução de ácido fosfórico contendo 200 mg/kg de nisina na superfície de salsichas antes de serem embaladas foi permitida pela Divisão de Operações Industriais do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, pertencente MAPA, em 1998 (Brasil, 1998).

Vários estudos têm demonstrado que a aplicação de nisina em produtos cárneos pode aumentar a vida de prateleira do produto ou torná-lo mais seguro (De Barros, 2009; Ofré *et al.*, 2008; Kalschne *et al.*, 2014). Na Austrália, a utilização de nisina (até 12,5 mg/kg) foi aprovada para qualquer produto de carne processada (FSANZ, 2007). Vários estudos têm mostrado a eficácia da nisina para inibir *L. monocytogenes* em carne crua, embutidos fermentados, salsichas e presunto cozido (Aymerich *et al.*, 2005;. Degnan *et al.*, 1992;. Hugas *et al.*, 1995;. Nielsen *et al.*, 1990), mas pouca pesquisa foi realizada em presunto curado.

As avaliações de risco indicam que 90% dos casos de listeriose nos EUA podem estar ligados ao consumo de RTE (FDA / FSIS / CDC, 2003). Além

disso, estima-se que 83% das mortes atribuídas a listeriose RTE estão ligadas ao produto fatiado ou em retalho, e destes cerca de 70% estão associados com o consumo de um produto formulado sem inibidores de crescimento (Endrikat *et al.*, 2011). Portanto, a utilização de antimicrobianos seguros à saúde do consumidor, como a nisina, pode ser uma opção atraente para reduzir o número de listerioses envolvendo produtos cárneos RTE, sendo necessário sua aprovação pelos órgãos fiscalizadores de cada país.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparação do Inóculo

O inóculo foi preparado a partir de um *pool* composto por cinco cepas de *L. monocytogenes*, sendo uma cepa de referência (ATCC 7644) e 4 isoladas de produtos cárneos e lácteos (J11, 55, 47 e a 7459), pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – ICTA/ UFRGS.

Para o preparo da cultura empregada na contaminação experimental, cada cepa foi cultivada, separadamente, em Caldo Triptona de Soja (Himedia Índia), suplementado com 0,6% de Extrato de Levedura (TSB-YE), por 18 h a 37 °C. Em seguida, um novo cultivo foi realizado em caldo TSB-YE a 37 °C, por 10 horas, para atingir o início da fase estacionária, que foi determinado por uma curva padrão de multiplicação. Volumes iguais de cada cultura (2ml) foram transferidos para um tubo Falcon e a mistura foi centrifugada a 2810 x g, durante 10 minutos, e o sedimento foi suspenso em água peptonada 0,1% (m/v) estéril. O processo foi repetido duas vezes, e a suspensão final foi adicionada de água peptonada 0,1%, até atingir uma densidade óptica (OD) de 0,5, a 600 nm, o que correspondeu a aproximadamente 10⁷ UFC/mL. Esta suspensão foi submetida a diluição com água peptonada 0,1%, a fim de obter uma população final de 10⁴ UFC/mL a ser utilizado na contaminação artificial dos presuntos.

4.2 Fabricação do Presunto

Em um primeiro momento, presuntos foram preparados na planta piloto de carnes do parque Industrial de Esteio/RS (DuPont) para os ensaios 1 e 2. Para o ensaio 3, os presuntos foram preparados pela planta piloto da Marsul Montenegro/RS.

Nisina comercial (Nisaplin®, Danisco, Copenhagen, Dinamarca) foi comprada por Danisco Brasil Ltda. De acordo com o fabricante a formulação continha 77,5% NaCl, 20% sólidos desnaturados de leite e 2,5% de nisina pura.

Empregou-se como matéria-prima carne de pernil suíno desossado e recorte suíno magro (5% de gordura). O pernil suíno foi injetado com uma salmoura preparada com a seguinte formulação (g por Kg): água gelada – 297,5; corante carmim de cochonilha – 0,15; tripolifosfato sódico – 3,8; ácido pirofosfato de sódio 1,5; Sal 15; Sal de cura 2,1; Glutamato monossódico 2,4; Proteína isolada de soja SuPRO® 548 20,6; Carragena Meatline®1240 5,1; Xarope de glicose Morex® 1940 10,1; Maltodextrina Morex® 1920 10,1; Aroma Califórnia 5,6 e Eritorbato de sódio 1,0.

Os ingredientes foram adicionados na seguinte ordem mostrada na Figura 3:

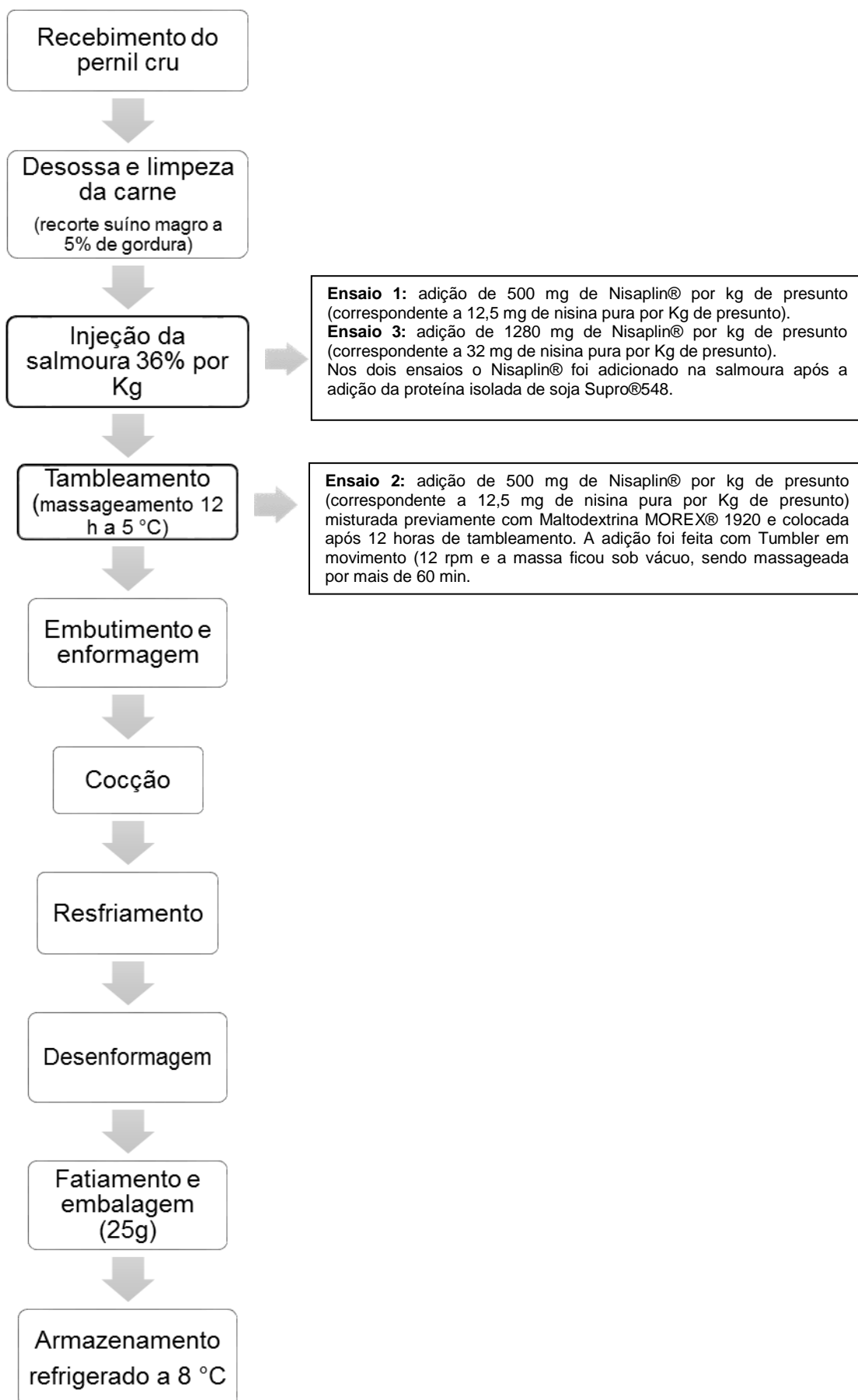


Figura 3. Fluxograma do processo de produção dos presuntos adicionados de nisina.

4.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana da Nisina em Presunto Cozido

Os presuntos foram avaliados para a presença de *L. monocytogenes*, através do método ISO 11290-1. Para teste da atividade antimicrobiana da nisina em presuntos cozidos foram realizados três diferentes ensaios, descritos a seguir:

4.3.1 Ensaio 1 e 2

Foi avaliada a ação antimicrobiana da nisina, utilizando a concentração aprovada no Brasil para queijos fundidos, requeijões e queijos pasteurizados (12,5 mg/kg). Os ensaios 1 e 2 diferiram na etapa de incorporação da nisina. No ensaio 1 a nisina foi adicionada na salmoura (Figura 4) e no ensaio 2 foi adicionada na emulsão cárnea na etapa de tambleamento (Figura 5). Os valores de Nisaplin® (produto comercial que contém 2,5% (m/m) de nisina pura) para obter as dosagens do ensaio 1, 2 (12,5 mg/kg de nisina) e 3 (32 mg/kg).

4.3.1.1 Ensaio 1: Adição de 500 mg de Nisaplin® por kg de presunto (correspondente a 12,5 mg de Nisina pura por kg de presunto) na etapa de produção da salmoura, após a adição da Proteína Isolada de Soja SUPRO® 548 (Figura 4).

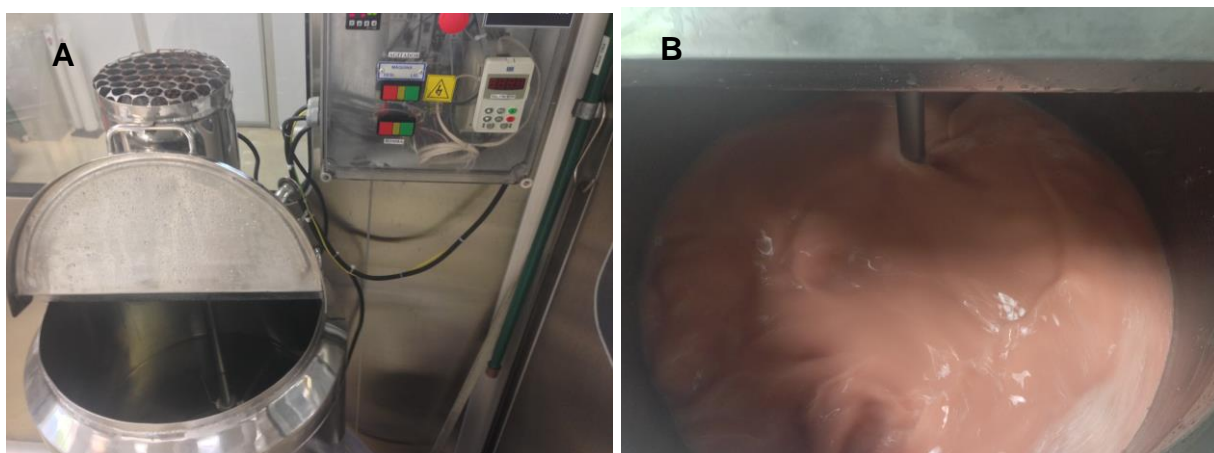


Figura 4. A – Tanque agitador NT para homogeneização da salmoura. B- Salmoura pronta para ser injetada na carne (com nisina 12,5 mg/kg). (fotos cedidas pela DuPont Esteio/RS 2014)

4.3.1.2 Ensaio 2: adição de 500 mg de Nisaplin® por kg de presunto (correspondente a 12,5 mg de nisina pura por Kg de presunto), previamente misturada com a quantidade de Maltodextrina Morex® 1920 prevista na formulação. Esta mistura foi adicionada na etapa do tangleamento, antes do envaze. A adição foi feita com o *tumbler* em movimento (12 rpm) e a massa ficou sob vácuo, sendo homogeneizada por mais de 60 minutos (Figura 5).



Figura 5. A – Tumbler Güther GPA 90 0,8W utilizado no processo para homogeneização da emulsão cárnea. B- Adição da Nisina diretamente na emulsão cárnea no tangleamento (fotos cedidas pela DuPont Esteio/RS 2015).

4.3.2 Ensaio 3

Foram adicionados 1280 mg de Nisaplin® por kg de presunto (correspondente a 32 mg de Nisina pura por Kg de presunto) na etapa de produção da salmoura, após a adição da Proteína Isolada de Soja SUPRO® 548. Posteriormente foi feita a injeção da salmoura na carne Figura 6.

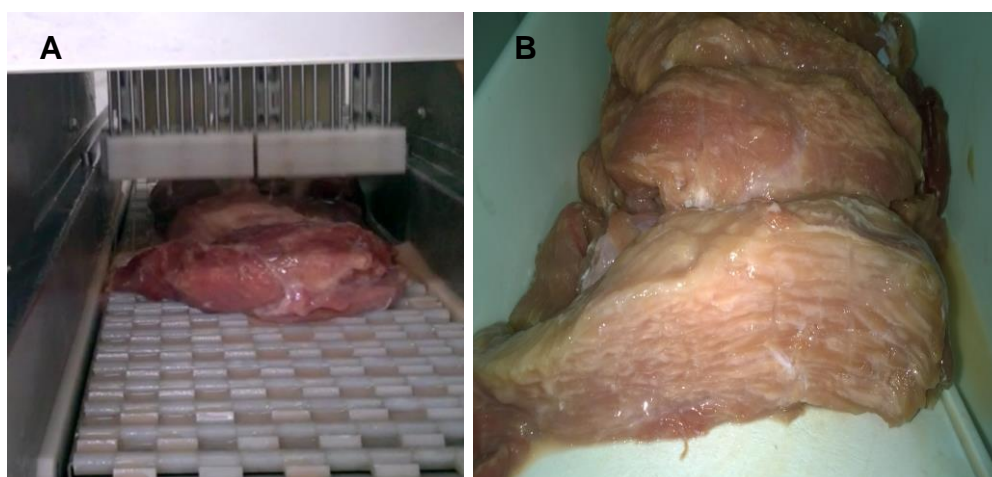


Figura 6. A- Injeção da salmoura no pernil na dosagem final de 32 mg/kg. B - aparência do pernil após a injeção (estrias claras são a salmoura retida nas fibras da carne). (fotos cedidas pela Marsul Montenegro/RS 2016).

4.4 Contaminação Experimental das Fatias de Presunto

Primeiramente, os presuntos fatiados com espessura de 0,5 mm e pesando 25 g foram testados para a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes a 45 °C e *Salmonella* spp., através dos respectivos métodos descritos por Silva (2010) e *Listeria* spp., através do método ISO 11290-1 (ISO, 1996).

No ICTA/UFRGS, os presuntos foram experimentalmente contaminados na superfície com 1 mL de uma suspensão bacteriana constituída por um *pool* de diferentes cepas de *L. monocytogenes*, conforme descrito no item 4.1. No ensaio 3, a superfície foi contaminada da mesma maneira, com um *pool* composto por 5 cepas de *L. monocytogenes* (ensaio 1 e 2) e somente com a cepa ATCC 7644 separadamente. Depois da contaminação artificial das superfícies das fatias, os sacos plásticos foram massageados manualmente durante 2 minutos e, em seguida, fechados com fita adesiva. Presuntos controle, sem adição da nisina, também foram fatiados. Os presuntos utilizados para avaliação das BAL não foram contaminados com *Listeria* spp. Os presuntos fatiados foram armazenados sob refrigeração a 8 °C, durante os experimentos.

4.5 Contagem de *L. monocytogenes* e Bactérias Ácido Láticas (BAL)

Foram analisadas amostras de presuntos cozidos fatiados e embalados individualmente em sacos plásticos estéreis, com peso aproximado de 25 g e formulados com 12,5 mg/kg de nisina nos ensaios 1 e 2, 32 mg/kg de nisina no ensaio 3 e sem nisina (controle). As fatias de presunto foram submetidas à contagem de *L. monocytogenes* e bactérias ácido lácticas nos tempos de 0, 24 horas (h), 48h, 10 dias (d), 20d, 30d e 40d no ensaio 1. Já no ensaio 2 e 3 os tempos foram de 0, 24 horas (h), 48h, 4 dias (d), 6d, 8d e 9d e 10d. Para

contagens de *L. monocytogenes*, fatias foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (m/L) em um homogeneizador *Stomacher* (Sward London) e a suspensão foi submetida a diluições decimais adequadas em água peptonada 0,1%. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas na superfície de ágar seletivo para *L. monocytogenes* (Chromocult® Merck, Darmstadt) e incubadas a 37 °C, durante 48 h. Para contagens de BAL, alíquotas de 1 mL de cada diluição foram semeadas em ágar MRS (Merck, Darmstadt) e incubada em jarra de anaerobiose a 30 °C, durante 48 h.

As análises de todos os experimentos foram realizadas em triplicata (A, B e C) e as contagens foram realizadas em duplicata.

4.6 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de Nisina

O método CBM foi adaptado da metodologia CLSI 2012 o qual a nisina foi determinada para as cinco cepas de *L. monocytogenes* separadamente e em combinação (mesmo *pool* utilizado nos ensaios em presunto). Primeiramente, a nisina foi diluída em HCl 0,01 M para formar uma solução estoque. Antes de cada experimento, a solução estoque contendo nisina foi diluída em tampão fosfato 10 mM (pH 6,4) para atingir uma concentração inicial de nisina de 1 mg/mL. Para determinar a CBM, utilizaram-se microplacas de Elisa de 96 poços com 100 µL de caldo Miller Hinton (MH, Sigma-Aldrich Saint Louis). No primeiro poço, adicionou-se uma solução de nisina que foi diluída no caldo MH, passando-se para o segundo poço e assim sucessivamente. Em seguida, foram adicionados 100 µL de uma suspensão bacteriana contendo 10⁵ UFC/mL de cada cepa de *L. monocytogenes* e as placas foram incubadas a 37 °C, por 24 h. Após, foram inoculados 20 µL de cada diluição em placas contendo ágar Chromocult® (Merck, Darmstadt), os quais foram incubadas 37 °C, por 24 h. CBM foi definida como a menor concentração em que não se observou multiplicação de *L. monocytogenes* nas placas de ágar Chromocult®. Controle negativo (MH e solventes) e positivo (MH e *L. monocytogenes*) foram feitos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Posteriormente, a CBM foi determinada para a salmoura (a mesma utilizada nos presuntos), utilizando a mesma metodologia descrita acima, porém com MH dupla concentração. No ensaio de CMB a salmoura foi avaliada em virtude de

descartar a possibilidade que os resultados obtidos nos ensaios com o presunto fossem devido a esta conter sais de cura (nitrito de sódio) além de avaliar a ação sinérgica ou antagônica com a nisina.

4.7 Determinação da nisina por HPLC-DAD-MSⁿ

A fim de determinar a concentração da nisina no composto comercial (Nisaplin® 2,5% de nisina pura), foi desenvolvido a metodologia para detectar e quantificar nisina por cromatografia líquida. Foi utilizado o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Shimadzu (Kyoto, Japão) operado pelo software LCsolutions, versão 1.23 SP1 (Shimadzu). Este foi o primeiro passo de definição da metodologia para futuramente determinar a nisina em amostras de presunto.

Os compostos catiônicos insolúveis do Nisaplin® foram separados em uma coluna XBridge® RP 18 (tamanho de partícula 5 µm, 150 mm x 4,6 mm) a 30 °C, com fase móvel, consistindo em água ultrapura (solvente A) e acetonitrila pura (solvente B) em gradiente não isocrático. Os espectros foram obtidos entre 214 e 280 nm e o cromatograma processado a 220 nm. Os espectros de massas foram adquiridos com um *scan range* de m/z 100 a 800, e os parâmetros do MS foram fonte ESI no modo de ionização positivo e voltagem do capilar 4000 V.

A identificação da nisina foi realizada considerando os seguintes parâmetros: tempo de retenção em uma coluna C18, características do espectro UV-visível (comprimento de onda de máxima de absorção $\lambda_{\text{máx}}$), espectro de massas comparado com padrão SIGMA-ALDRICH (referência N5764, Brasil) analisado sob as mesmas condições e dados da literatura (Di Stefano *et al.* 2012).

4.8 Análise Estatística

Para as análises comparativas nos ensaios do presunto entre o grupo teste com nisina e grupo controle (comparação intergrupos) e do mesmo grupo (comparação intragrupos) foi realizado o teste estatístico de *Bonferroni*. A avaliação estatística de *Bonferroni* foi preconizada porque, segundo Pimentel-Gomes (2009), esse teste é um aperfeiçoamento do teste T e pode ser aplicado a contrastes mais complexos. Define-se contraste como um vetor de médias em que a soma dos

coeficientes é igual a zero (Constant, 2004). Contraste é usado para comparação entre médias de tratamento, por combinação ou por pares de médias. O contraste é formado por médias e existe uma relação direta entre grau de liberdade e número de contrastes ortogonal. Além disso, o teste estatístico de *Bonferroni* foi utilizado, porque proporciona bons resultados para pequeno número de contrastes, e é mais conservador do que o teste de *Tukey*. Os valores marcados com asterisco mostram a significância estatística intergrupos e as letras são a comparação intragrupo (letras iguais não diferem).

Para os ensaios de CMB foram adotados dois testes estatísticos: o teste de *Dunnet* e o teste de *Student-Newnam Keuls*. O teste de *Dunnet* foi escolhido porque, segundo *Vieira et al.* (1989), este teste é adequado para comparar as médias dos tratamentos apenas com a média do controle. O teste de *Student-Newnam Keuls*, de acordo com *Sampaio* (2002), contorna os inconvenientes do teste T para ensaios com dois tratamentos, pois alguns autores consideram errado aplicar o teste T para comparação de médias, duas a duas.

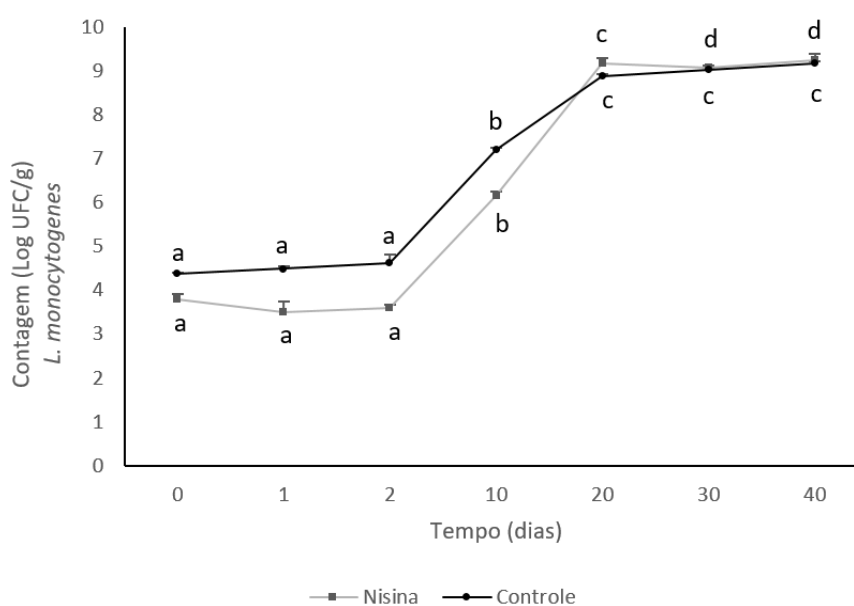
O software utilizado para avaliar os resultados foi o SPSS versão 21. Para todos os testes estatísticos foi adotado o nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Ensaio 1:

5.1.1 Atividade da nisina contra *L. monocytogenes* em presunto cozido, fatiado, durante o armazenamento a 8 °C

Os resultados das contagens de *L. monocytogenes* nas amostras de presunto cozido, contendo 12,5 mg/kg de nisina adicionada na salmoura e armazenado a 8 °C estão apresentados na Figura 7.



a,b,c,d,e comparação intragrupo (letras iguais não diferem pelo teste de *Bonferroni* a 5% de significância).

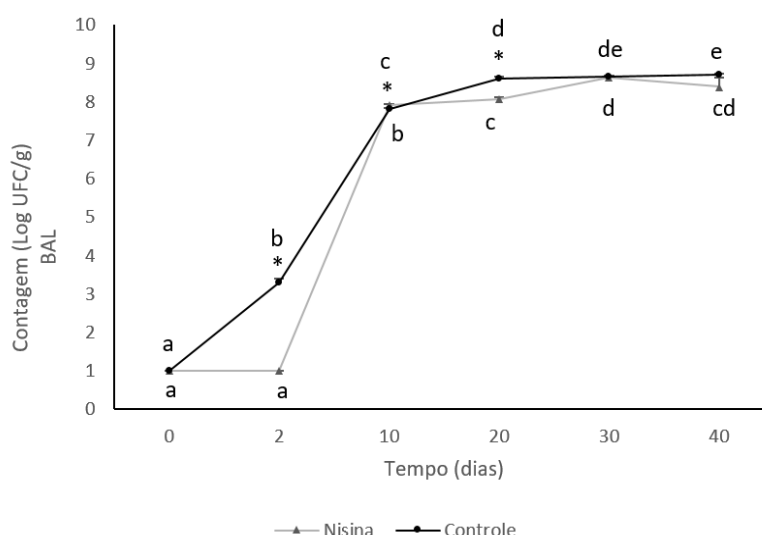
Figura 7. Contagem do *pool* de *L. monocytogenes* (log UFC/g) em presunto cozido, com (12,5 mg/kg) e sem nisina (controle) armazenado a 8 °C, por 40 dias.

As contagens de *L. monocytogenes* nas fatias de presunto cozido nos primeiros 2 dias a 8 °C permaneceram estáveis. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) tanto no grupo controle (sem nisina) quanto no presunto teste. No primeiro dia de armazenamento, observou-se um declínio de 0,3 log UFC/g nas fatias contendo nisina. Nas contagens do controle houve um aumento de 0,11 log UFC/g de *L. monocytogenes* nas fatias de presunto cozido. No segundo dia, as fatias de presunto contendo nisina tiveram um aumento de 0,11 log UFC/g, enquanto nas do controle 0,13 log UFC/g. No 10º dia, o presunto contendo nisina teve um aumento na contagem de *L. monocytogenes* de 2,54 log UFC/g e o presunto controle 2,57

UFC/g. A partir do 20º dia, as contagens atingiram a fase estacionária, tanto no presunto controle como no presunto contendo nisina (Figura 7). O presunto teste (contendo nisina) não demonstrou diferença significativa comparado com o controle pelo teste de *Bonferroni* a 5% de significância.

5.1.2 Atividade da nisina contra bactérias ácido lácticas em presunto cozido, fatiado, durante o armazenamento a 8 °C.

As contagens das BAL nas amostras de presunto cozido, contendo 12,5 mg/kg de nisina, adicionada na salmoura e armazenado a 8 °C estão apresentados na Figura 8.



* comparação intergrupos (diferença estatisticamente significativa pelo teste de *Bonferroni* a 5% de significância)

a,b,c,d,e comparação intragrupo (letras iguais não diferem pelo teste de *Bonferroni* a 5% de significância)

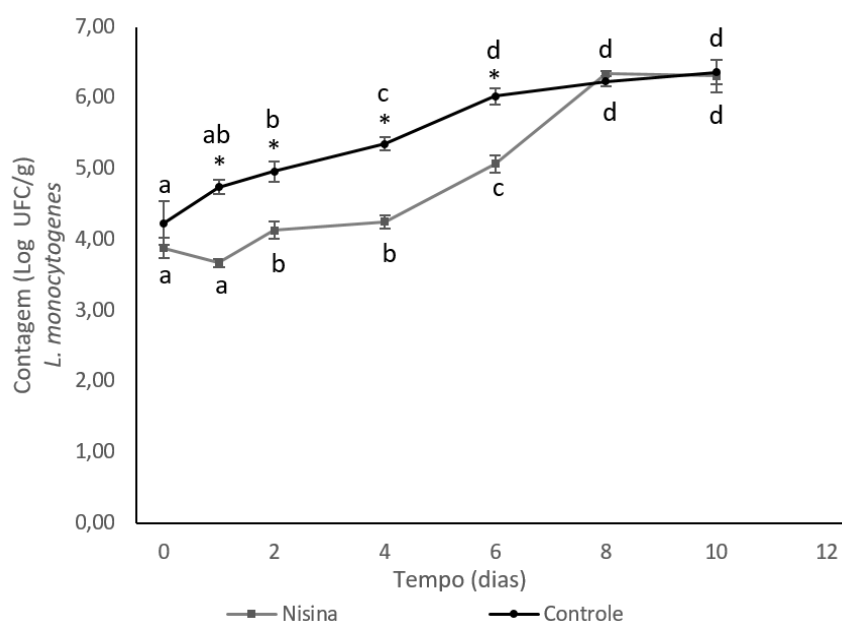
Figura 8. Contagem das BAL (log UFC/g) naturalmente presentes em presunto cozido, com (12,5 mg/kg), e sem nisina (controle) armazenado a 8 °C por 40 dias.

As contagens das BAL permaneceram abaixo do limite de detecção, por 2 dias, no presunto cozido contendo nisina. Entretanto, no presunto controle (sem nisina), observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) de 2,31 log UFC/g nas contagens das BAL. No 10º dia, tanto as fatias de presunto contendo nisina como as fatias controle atingiram a fase estacionária, a qual correspondeu a aproximadamente 8 log UFC/g. De acordo com a Figura 8, a nisina inibiu significativamente a multiplicação das BAL por 2 dias ($p < 0,05$).

5.2 Ensaio 2:

5.2.1 Atividade da nisina contra *L. monocytogenes* em presunto cozido, fatiado, durante o armazenamento a 8 °C.

Os resultados das contagens de *L. monocytogenes* nas amostras de presunto cozido, contendo 12,5 mg/kg de nisina, adicionada no tambeamento, e armazenada a 8 °C, então apresentados na Figura 9.



* comparação intergrupos (diferença estatisticamente significativa pelo teste de *Bonferroni* a 5% de significância)

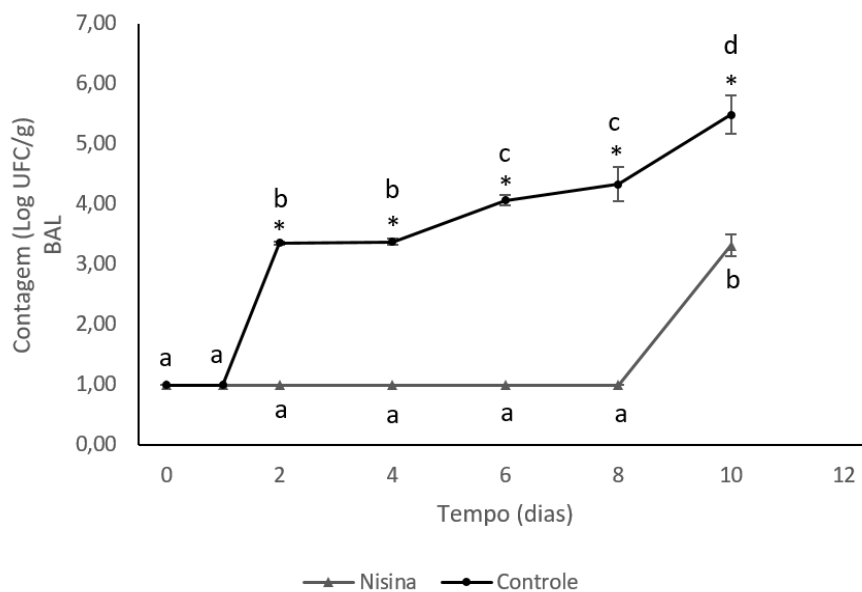
a,b,c,d,e comparação intragrupo (letras iguais não diferem pelo teste de *Bonferroni* a 5% de significância)

Figura 9. Contagem do pool de *L. monocytogenes* (log UFC/g) em presunto cozido, com (12,5 mg/kg) e sem nisina (controle) armazenado a 8 °C, por 10 dias.

No primeiro dia de armazenamento, observou-se um declínio na contagem do patógeno de 0,21 log UFC/g nas fatias contendo nisina, enquanto no controle houve um aumento de 0,51 log UFC/g. As contagens de *L. monocytogenes* permaneceram na fase estacionária por 6 dias no presunto controle, mas no presunto tratado com nisina somente em 8 dias. Conforme os resultados apresentados na Figura 9, as contagens no presunto teste (contendo nisina) demonstrou diferença significativa até o sexto dia comparado com o controle pelo teste de *Bonferroni* a 5% de significância. No sexto dia, a diferença entre o tratamento e o controle foi de aproximadamente 1 log UFC/g de *L. monocytogenes*.

5.2.2 Atividade da nisina contra bactérias ácido lácticas em presunto cozido, fatiado, durante o armazenamento a 8 °C.

Os resultados das contagens das BAL nas amostras de presunto contendo 12,5 mg/kg de nisina adicionada no tambleamento e armazenado a 8 °C então apresentados na Figura 10.



* comparação intergrupos (diferença estatisticamente significativa pelo teste de *Bonferroni* a 5% de significância)

a,b,c,d,e comparação intragrupo (letras iguais não diferem pelo teste de *Bonferroni* a 5% de significância)

Figura 10. Contagem das BAL (log UFC/g) naturalmente presentes em presunto cozido, com (12,5 mg/kg), e sem nisina (controle) armazenado a 8 °C por 10 dias.

As contagens das BAL foram menores que 10 Log UFC/g nas fatias de presunto cozido com nisina e controle no primeiro dia de armazenamento a 8 °C. Isso pode ser uma indicação das boas condições de higiene no fatiamento e na peça do presunto, visto que as BAL não foram inoculadas artificialmente no presunto fatiado. Conforme a Figura 10, o presunto contendo nisina obteve diferença significativa até o décimo dia comparado com o controle pelo teste de *Bonferroni* a 5% de significância.

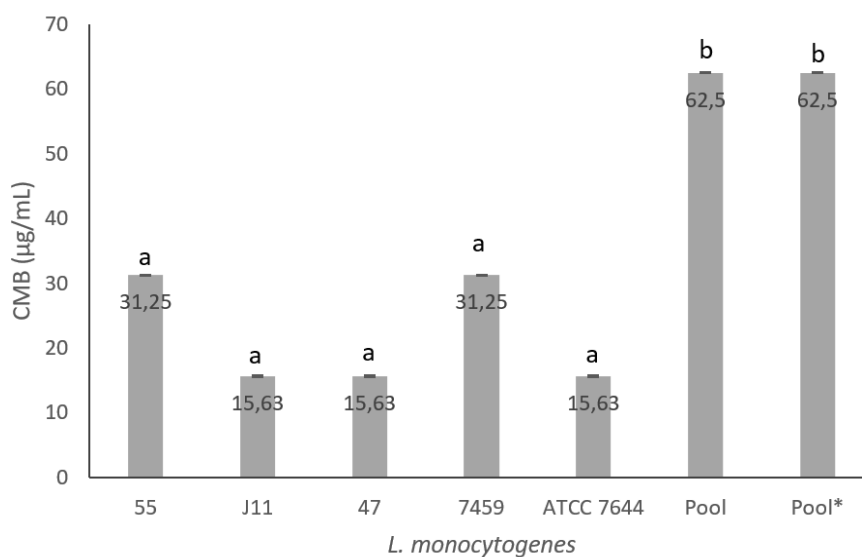
5.3 Concentração mínima bactericida - CMB

Em vista dos resultados obtidos nos ensaios 1 e 2, determinou-se a CMB, a fim de averiguar a sensibilidade à nisina isoladamente de cada cepa e do *pool* de *L. monocytogenes*, sem a interferência da matriz cárnea. Além disso, a CMB foi determinada utilizando a salmoura com a finalidade de descartar a possibilidade que os resultados obtidos fossem devido ao presunto conter sais de cura (nitrito de sódio) e a possível ação sinérgica ou antagônica da salmoura e nisina.

5.3.1 CMB da nisina sobre isolados de *L. monocytogenes* separadamente e em combinação

Resultados apresentados na Figura 11 mostram diferentes sensibilidades das cepas de *L. monocytogenes* à nisina. A média de CMB dos isolados 55 e 7459 foi de 31,25 µg/mL, já para as cepas J11, 47 e ATCC 7644 a média foi 15,63 µg/mL. Os valores de CMB dos *pools* foram o dobro comparado com os isolados 55 e 7459.

Além disso, a Figura 11 mostra que a cepa ATCC 7644 e os demais isolados de *L. monocytogenes* não tiveram diferença entre si ($p > 0,05$), mas diferiram do *pool* ($p < 0,05$). Já os *pools* (*pool* com todas as cepas de *L. monocytogenes* utilizadas nos ensaios e o *pool* sem o isolado selvagem 7459) não diferiram entre si pelo teste *Student-Newnam Keuls*. O objetivo de fazer o *pool* sem o isolado selvagem 7459 foi para averiguar se este não era um dos fatores que garantiria a menor sensibilidade do *pool*, visto que, em ensaios prévios, o isolado 7459 apresentou um dos maiores valores de CMB.



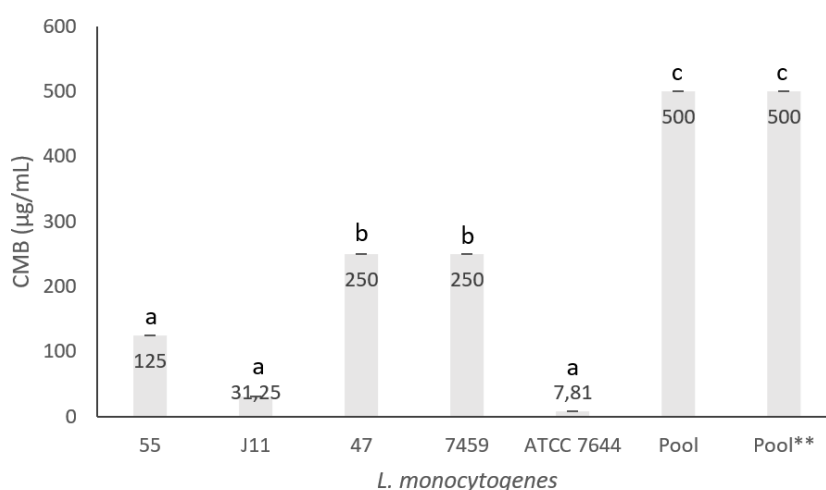
a,b Letras iguais não diferem pelo teste de *Student-Newnam Keuls* a 5% de significância

*Pool sem o isolado selvagem de *L. monocytogenes* 7459

Figura 11. Perfil de sensibilidade de culturas de *L. monocytogenes* para nisina.

5.5.2 CMB de salmoura contendo nisina sobre Isolados de *L. monocytogenes* separadamente e em combinação

Os resultados da CMB com salmoura, referente a cepa ATCC 7644 e aos isolados individualmente e em conjunto são mostrados na Figura 12.



a,b Letras iguais não diferem pelo teste de *Student-Newnam Keuls* a 5% de significância

**Pool sem o isolado selvagem de *L. monocytogenes* 47

Figura 12. Perfil de sensibilidade de culturas de *L. monocytogenes* para nisina e Salmoura.

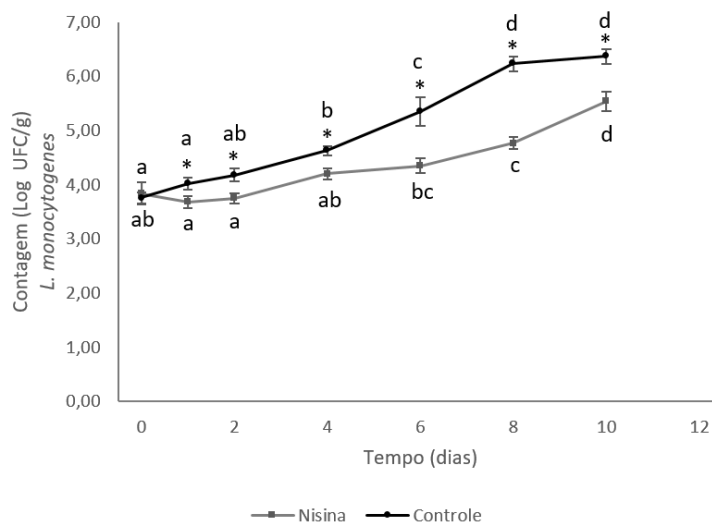
Resultados apresentados na Figura 12 mostram diferentes sensibilidades das cepas de *L. monocytogenes* à nisina. A média de CMB dos isolados 47 e 7459 foi de 250 µg/mL, do isolado 55 foi de 125 µg/mL, do isolado j11 foi de 31,25 µg/mL e a ATCC teve a menor média de 15,63 µg/mL. Os valores de CMB dos *pools* (*pool* com todas as *L. monocytogenes* utilizadas nos ensaios e o *pool* sem o isolado selvagem 47) apresentaram menor sensibilidade e não diferiram entre si ($p>0,05$) com a média de CMB de 500 µg/mL. Os valores de CMB dos *pools* foram o dobro comparado com os isolados 47 e 7459. A cepa ATCC e os isolados não tiveram diferença entre si, embora a cepa ATCC 7644 tenha apresentado maior sensibilidade a nisina e a salmoura. A cepa ATCC e os isolados diferiram de ambos os *pools* e estes não diferiram entre si pelo teste *Student-Newnam Keuls* ($p>0,05$).

5.4 Ensaio 3:

A partir dos resultados obtidos na avaliação da CMB, realizou-se o ensaio 3, utilizando uma dosagem superior de nisina (32 mg/kg) em comparação aos ensaios 1 e 2. Além disso, esse ensaio foi realizado utilizando o *pool* de *L. monocytogenes* e, separadamente, a cepa ATCC 7644. O ensaio somente com a cepa ATCC 7644 teve o objetivo de avaliar se a sua maior sensibilidade observada no teste de CBM se refletiria na matriz cárnea.

5.4.1 Atividade da nisina contra *L. monocytogenes* em presunto cozido, fatiado, durante o armazenamento a 8 °C.

Os resultados das contagens de *L. monocytogenes* nas amostras de presunto contendo 32 mg/kg de nisina adicionada na salmoura e armazenada a 8 °C estão apresentados na Figura 13, correspondendo as contagens desde o tempo 0 até 10 dias.



* comparação intergrupos (diferença estatisticamente significativa pelo teste de *Bonferroni* a 5% de significância)

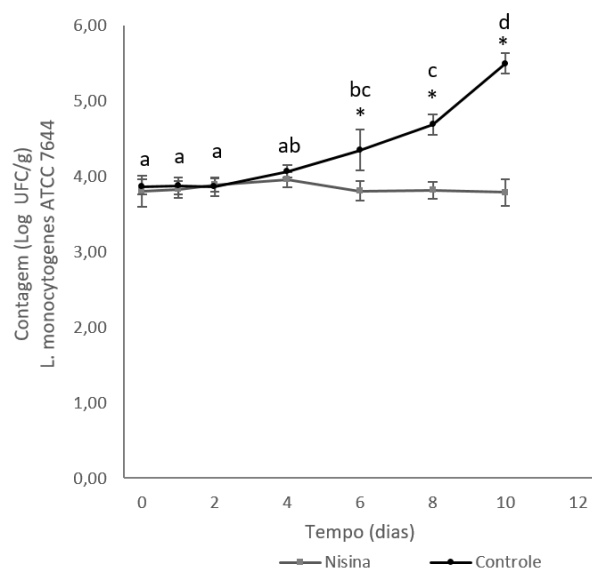
a,b,c,d,e comparação intragrupo (letras iguais não diferem pelo teste de *Bonferroni* a 5% de significância)

Figura 13. Contagem do pool de *L. monocytogenes* (log UFC/g) em presunto cozido, com (32 mg/kg) e sem nisina (controle) armazenado a 8 °C, por 10 dias.

No primeiro dia de armazenamento, observou-se um declínio de 0,16 log UFC/g nas fatias de presunto contendo nisina. No presunto controle houve um aumento de 0,26 log UFC/g nas contagens de *L. monocytogenes*. No segundo dia, as fatias de presunto contendo nisina demonstram um aumento de 0,07 log UFC/g e nas fatias de presunto controle, 0,20 log UFC/g. Conforme os resultados apresentados na Figura 13, a contagem no presunto teste (contendo nisina) teve diferença significativa do dia um até o décimo dia de tratamento, comparado com o controle, segundo teste de *Bonferroni* a 5% de significância.

5.4.2 Atividade da nisina contra cepa ATCC 7644 em presunto cozido, fatiado, durante o armazenamento a 8 °C.

Os resultados das contagens da cepa ATCC 7644 nas amostras de presunto contendo 32 mg/kg de nisina adicionada na salmoura e armazenada a 8 °C estão apresentados na Figura 14.



* comparação intergrupos (diferença estatisticamente significativa pelo teste de *Bonferroni* a 5% de significância)

a,b,c,d,e comparação intragrupo (letras iguais não diferem pelo teste de *Bonferroni* a 5% de significância)

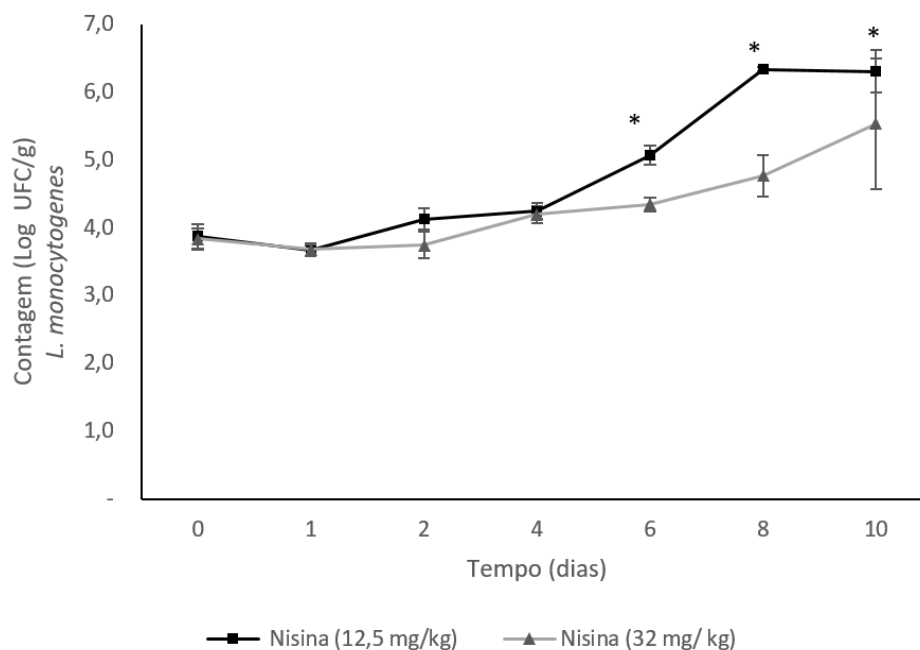
Figura 14. Contagens da cepa ATCC 7644 de *Listeria monocytogenes* (log UFC/g) em presunto cozido contendo nisina (32 mg/kg), armazenado a 8 °C, por 10 dias.

No primeiro dia de armazenamento, observou-se um declínio de 0,02 log UFC/g nas fatias contendo nisina. Nas contagens do controle houve um aumento de 0,02 log UFC/g e partir do segundo dia de armazenamento do presunto controle, houve um aumento de 0,28 UFC/g na contagem de *L. monocytogenes*, iniciando a fase exponencial de multiplicação. Já no presunto tratado, *L. monocytogenes* ATCC 7644 permaneceu em fase lag ao longo de todo o experimento (10 dias), indicando que a concentração de nisina utilizada (32 mg/kg) foi eficaz no controle desta. Pelo teste de *Bonferroni* foi significativa a diferença intergrupos do 6º dia até 10º dia ($p < 0,05$).

5.5 Comparação entre os ensaios 2 e 3 das contagens de *L. monocytogenes* nas amostras de presunto cozido fatiado

Os resultados do ensaio 2, referente às contagens de *L. monocytogenes* nas amostras de presunto contendo 12,5 mg/kg de nisina, adicionada no tambeamento, estão apresentados na Figura 15, juntamente com os resultados do

ensaio 3 das contagens de *L. monocytogenes*, nas amostras de presunto contendo 32 mg/kg de nisina adicionada na salmoura, ambos armazenados a 8 °C. Essa Figura foi elaborada com a finalidade de comparar os dois processos e comportamento do *pool* de *L. monocytogenes* expostas a diferentes dosagens de nisina.



* comparação entre os ensaios estatisticamente significativa pelo teste de *Bonferroni* a 5% de significância

Figura 15. Contagem do *pool* de *L. monocytogenes* (log UFC/g) em presunto cozido contendo nisina (12,5mg/kg) (linha mais escura). Contagem do *pool* de *Listeria monocytogenes* (log UFC/g) em presunto cozido contendo nisina (32mg/kg), (linha mais clara).

Conforme os resultados apresentados na Figura 15, foi possível observar que a maior dosagem de nisina (32 mg/kg) aumentou a fase lag de *L. monocytogenes* em 6 dias, enquanto que na concentração de 12,5 mg/kg o patógeno permaneceu em fase lag somente 1 dia. Nos dias 6, 8 e 10 houve diferença significativa intergrupos pelo teste de *Bonferroni* ($p < 0,05$). Além disso, os resultados mostram que na maior concentração de nisina o patógeno manteve contagens inferiores em relação a menor concentração de nisina no presunto, sugerindo que nessa matriz alimentar é necessário aumentar a concentração da bacteriocina para atingir um efeito desejável na inibição de *L. monocytogenes*.

5.6 Determinação da concentração de nisina no produto Nisaplin® HPLC-DAD-MS

A Concentração de nisina foi determinada no produto Nisaplin® (2,5% de nisina pura) a partir da curva analítica representada na Figura 16.

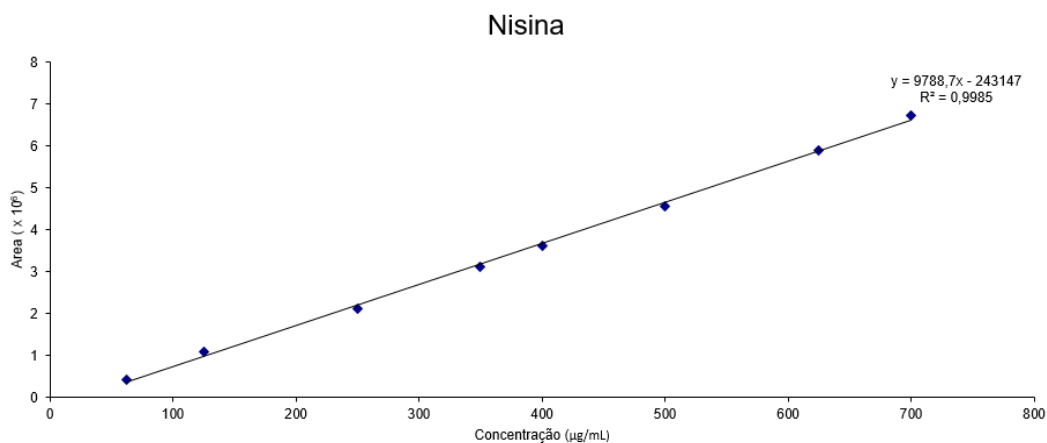


Figura 16. Curva analítica da nisina comercial (Nisaplin®) analisado por HPLC-DAD. O eixo y indica a área do cromatograma e o eixo x indica a concentração da nisina.

Conforme resultados apresentados na Figura 17 a seta no cromatograma indica o pico de saída da nisina no tempo de corrida total de 12 minutos.

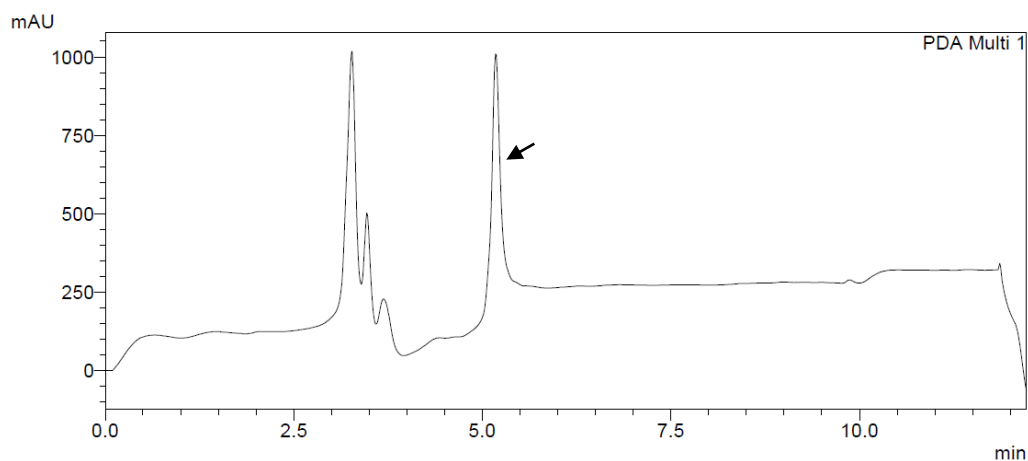


Figura 17. Separação cromatográfica da nisina comercial Nisaplin® no espectro 220 nm.

A partir dos resultados obtidos através do HPLC (Figura 18) foi feita a identificação pelo MS da nisina (Nisaplin®) de acordo com espectro de massas apresentados na Figura 16 e a Tabela 3, referente à distribuição isotópica.

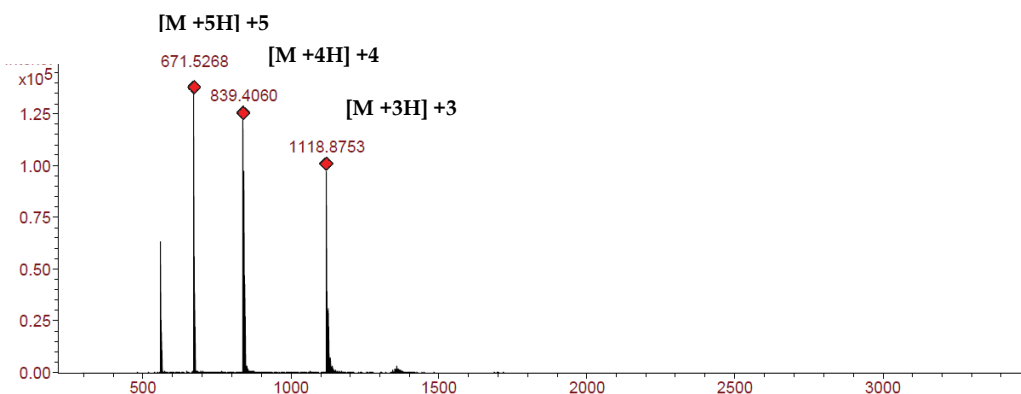


Figura 18. Identificação por HPLC-MS da nisina (Nisaplin®).

Tabela 3. Distribuição isotópica nisina A (massa molecular 3354.07 Da)

Carga [M + nH] ⁿ⁺	Massa Média encontrada	Massa Média Teórica
		3354,07
1	n.d ¹	3355,08
2	n.d ¹	1678,04
3		1118,87
4		839,40
5		671,52

¹ não detectado

O método permitiu a identificação e confirmação da concentração de 2,52% de nisina pura no produto comercial Nisaplin® predito no laudo do fabricante.

Além disso, a metodologia criada teve a vantagem de reprodutibilidade (Figura 16), seletividade relativa e um tempo de corrida curto.

6. DISCUSSÃO

Embora a nisina tenha sido utilizada com sucesso como conservante em numerosas matrizes alimentares (Gorris & Bennik, 1994), esta demonstra uma eficácia variável em produtos cárneos. Vários motivos para isso foram identificados, tais como a natureza dos micro-organismos deteriorantes e parâmetros de preservação (Fowler & Gasson 1991), ligação da nisina nas proteínas da carne (Aasen *et al.* 2003; Davies & Delves-Broughton 1999; Rayman *et al.* 1983), degradação da nisina por proteases da carne (Aasen *et al.* 2003; Murray & Richard, 1997), a falta de homogeneidade da mistura (Davies & Delves-Broughton 1999), adsorção pela gordura (Aasen *et al.* 2003; Jaber *et al.* 2000), condições do pH (Rayman *et al.* 1983; Davies & Delves-Broughton 1999) e temperatura de armazenamento (Gálvez *et al.*, 2007).

A mesma formulação de presunto foi usada nos 3 ensaios, sendo que apenas a etapa em que a nisina foi adicionada e sua concentração foram variadas. No ensaio 1 adição de 12,5 mg/kg de nisina na etapa de produção da salmoura; no ensaio 2 adição de 12,5 mg/kg de nisina na etapa de homogeneização da mistura cárnea e no ensaio 3 adição de 32 mg/kg de nisina na etapa de produção da salmoura. Nos três ensaios a nisina ficou em contato com a carne crua e curada por um período entre 1 a 12 horas. Durante esse período, diversas reações podem ter ocorrido entre a nisina e as enzimas presentes na carne sugerindo uma diminuição na dosagem real no produto pronto. Comparando o ensaio 1 com o ensaio 2, observou-se que a adição da nisina na etapa de tamberamento (ensaio 2) teve um melhor efeito inibitório. Isso pode ter ocorrido devido ao menor tempo de contato da nisina com a carne.

Resultados preliminares (não mostrados) obtidos a partir de análise por HPLC demonstraram indícios de que houve uma diminuição significativa da concentração da nisina, em 24 horas, no presunto cru (amostra retirada antes do processo de cocção na caldeira) diferentemente do presunto cozido (amostra de presunto cozido pronto para o consumo). Essa diminuição na concentração de nisina no período de cura pode refletir num menor efeito antimicrobiano. Esse pode ser um dos motivos pelos quais a adição de 12,5 mg/kg de nisina não foi suficiente para inibir *L. monocytogenes*, por mais de 2 dias, em presunto cozido diferentemente da

ação obtida em produtos lácteos, os quais diversos autores mostram que essa concentração foi suficiente para inibir o patógeno (Davies *et al.*, 1999; Malheiros *et al.*, 2010; Malheiros *et al.*, 2012).

Rose *et al.* (2003) isolaram, a partir de músculo de carne crua, a enzima glutationa S-transferase (GST), que catalisa a reação entre nisina e glutationa, e verificaram que em temperatura superior a 37 °C, três moléculas de glutationa reagiram com uma molécula de nisina, inativando-a totalmente. Em temperatura de refrigeração (4 °C), a reação foi mais lenta e resultou na adição de uma molécula de glutationa a uma de nisina (Gálvez *et al.*, 2007), ou seja, a temperatura superior a 37 °C com a ação da GST também é um fator provável da inativação da nisina.

No ensaio 1, na dosagem de 12,5 mg/kg de nisina adicionada na salmoura, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na inibição da multiplicação da *L. monocytogenes* no presunto tratado em relação ao presunto controle (Figura 7). Isso pode ter ocorrido devido à diminuição da concentração da nisina causada pela ligação com GST e gordura. Em relação à BAL, obteve-se um aumento da fase lag por até 2 dias. O sucesso contra BAL se resulta por elas terem uma maior sensibilidade a nisina (CCFA 2013). A utilização proposta para nisina contra BAL (bactérias degradadoras presentes naturalmente no presunto) é de impedir a multiplicação das cargas destas. Cabe ressaltar que, todos os produtos à base de carne contendo nisina ainda deve ser produzidos em condições de boas práticas de fabricação e, portanto, essa bacteriocina não deve ser empregada com o intuito ludibriar o consumidor, possibilitando a comercialização de produtos de qualidade inferior ou insalubres.

Davies *et al.* (1999) verificaram que a adição de nisina (6,25 µg/g) inibiu o multiplicação de BAL inoculadas em mortadela embalada a vácuo (pasteurizada) e estocada a 8 °C. As amostras controles deterioraram em torno do 7º dia, enquanto as amostras tratadas permaneceram sem deterioração por um período maior que 50 dias.

Kalschne *et al.* (2014) adicionaram nisina (0,013%, 0,007% ou 0,001%) na salmoura (10% do peso da carne) em presunto cozido embalado a vácuo e obtiveram resultados de contagem total de BAL menores (2 a 3 ciclos log) em comparação com o controle (sem nisina) durante o armazenamento refrigerado, por 60 dias.

No ensaio 2, avaliou-se os 10 primeiros dias de armazenamento, visto que no primeiro ensaio observou-se que esse período abrangeu as fases lag, exponencial e estacionária da *L. monocytogenes* em presunto cozido. Os dez dias foram preconizados também, em vista dos argumentos da revisão literária que menciona a maior contaminação de *L. monocytogenes* em produtos fatiados em mercados, nos quais a validade é em torno de 4 dias (Martins & Germano 2011; Chaitiemwong *et al.* 2014). Resultados do ensaio 2 demonstram que a fase lag foi estendida por dois dias e, após, a *L. monocytogenes* retomou a multiplicar-se e até ultrapassou no oitavo dia o controle (Figuras 7 e 9).

Trabalhos anteriores mencionam que não só algumas cepas de *L. monocytogenes* possuem uma resistência inata à nisina, mas estas cepas também podem desenvolver resistência a nisina, através da exposição a concentrações que são muito baixas para exercer um efeito bactericida (Crandall & Montville, 1998; Kaur *et al.*, 2011) o que pode ser uma explicação da recuperação da *L. monocytogenes* maior que o controle nos dois primeiros ensaios, os quais a dosagem de nisina não foi suficiente para ter uma ação bactericida. Portanto, quando se utiliza nisina como um aditivo para inibir a *L. monocytogenes*, a concentração preconizada no final no produto deve permitir alcançar um efeito bactericida. Concentrações inferiores são incapazes de inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* e podem permitir que se desenvolva resistência à nisina.

Alguns pesquisadores sugerem que o desenvolvimento da resistência pode ocorrer de diversas maneiras (Kaur & Singh *et al.*, 2011) dentre elas modificações na composição dos fosfolípidios da membrana bacteriana (Ming & Daeschel, 1995; Verheul *et al.*, 1997), modificações na estrutura da parede celular, na carga final da membrana (evitando assim a atração/adesão do peptídeo) (Crandall & Montville, 1998; Paiva; Breukink & Mantovani, 2011) e, por fim, a presença de uma enzima inativadora (GST) (De Vuyst & Vandamme, 1994).

Miyamoto *et al.* (2015) forneceram evidências de mecanismos de sobrevivência bacteriana da *L. monocytogenes* ATCC 7644 induzida por um ambiente com uma concentração sub-letal de nisina. A bactéria manteve em parte sua capacidade de multiplicação, possivelmente pelo desencadeamento de um mecanismo alternativo de divisão de forma L-mediada. Além disso, sugerem um possível aumento da motilidade, que permite que a bactéria fuja de um ambiente contendo nisina. Estes mecanismos de sobrevivência evidenciados em resposta a

nisina pode estar em outras cepas de *L. monocytogenes* e outros agentes patogênicos de alimentos sensíveis a essa bacteriocina.

Assim, é indispensável conhecer as linhagens que comumente causam contaminação em alimentos, bem como seu perfil de sensibilidade, a fim de evitar seu uso contínuo e o desenvolvimento de cepas resistentes (Crandall & Montville, 1998).

O emprego da nisina em conjunto com outras tecnologias de conservação ou com outros antimicrobianos pode ser uma alternativa para a diminuição das concentrações necessárias para o efeito bactericida e/ou bacteriostático e ainda aumentar o espectro antimicrobiano desta bacteriocina (Dykes & Moorhead, 2002; Samelis *et al.*, 2005).

Outra hipótese para a perda da bioatividade da nisina é que ela se ligue a com moléculas de compostos insolúveis em água, tais como gordura. Resultados *in vitro* obtidos por Glass Johnson (2004) suportam a hipótese de que o elevado teor de gordura em alguns produtos de queijo processado possam reduzir a atividade antimicrobiana da nisina. Assim, a ligação da nisina a gordura parece bloquear a sua atividade. Nisina foi utilizada em leite desnatado (0,1 mg/ml) com êxito para o controle de *L. monocytogenes* quando o produto foi armazenado a 4 °C, por até 14 dias. No mesmo trabalho, quando aplicada em leite integral, a bacteriocina, em concentração de 0,1 mg/ml, auxiliou no controle do patógeno, porém não inibiu sua multiplicação ao longo do período de armazenagem (Malheiros *et al.*, 2010).

O teor de gordura pode interferir na distribuição uniforme e tornar a nisina indisponível para ação sobre a(s) bactéria(s) alvo(s). Davies *et al.* (1999) verificaram que a atividade antimicrobiana da nisina em mortadela tipo Bologna teve um efeito superior em amostras com menor conteúdo de gordura. Reunanen e Saris (2004) estudaram a preservação da atividade antimicrobiana da nisina em salsicha cozida e verificaram que a bacteriocina resistiu ao processo de cozimento e, em 10 dias de estocagem a 6 °C, a concentração de nisina detectada foi de 55% em relação à quantidade inicialmente adicionada, porém as análises posteriores ao décimo dia detectaram um aumento na concentração da bacteriocina, chegando a atingir 68%, após 28 dias de estocagem a 6 °C. Os autores concluíram que este fenômeno é explicado pela liberação de gordura do produto durante a estocagem resfriada e concomitante aumento da solubilidade da nisina.

Outro fator importante para a bioatividade da nisina refere-se à interferência de componentes da carne, tais como fosfolipídeos que limitam a sua atividade ou devido à presença de enzimas proteolíticas presentes nesses produtos (Deegan *et al.*, 2006). Certos aditivos alimentares têm-se mostrados antagônicos à nisina. Por exemplo, a nisina é degradada na presença de metabissulfito de sódio (reduzidor forte) e dióxido de titânio (oxidante forte), os quais são muitas vezes utilizados em alimentos (Delves-Broughton *et al.*, 1996).

Além disso, Pellicer *et al.* (2011) analisaram o efeito da temperatura, conteúdo de gordura, cloreto de sódio e o uso de conservantes (nitrito de sódio, ácido láctico e nisina) na multiplicação de *L. monocytogenes* no sistema de emulsão cárnea. Os parâmetros foram testados individualmente e combinados. Os autores observaram que a combinação do ácido láctico com nitrito de sódio ou com nisina, potencializaram o efeito inibitório.

No ensaio de CMB a salmoura foi avaliada em virtude de descartar a possibilidade que os resultados obtidos nos ensaios com o presunto fossem devido a esta conter sais de cura (nitrito de sódio) além de avaliar a ação sinérgica ou antagônica com a nisina.

Rayman *et al.* (1981) testou a combinação de 75 mg/kg de nisina com 40 mg/kg de nitrito de sódio e observou menores contagens do que 150 mg/kg de nitrito sozinho, contra esporos do *Clostridium sporogenes* PA3679 em suspensões de carne, que foram aquecidas para simular o processo de cocção do presunto. Os pesquisadores concluíram que a combinação nisina-nitrito parece ter um efeito sinérgico, e a baixa concentração de nitrito de sódio foi suficiente para preservar a cor em carnes semelhante ao de produtos curados com 150 mg/kg de nitrito, logo seria uma boa opção a adição da nisina para diminuição da dosagem de nitrito.

Entretanto, neste trabalho, a CMB demonstrou um efeito antagônico entre a nisina e a salmoura (Figura 15). O trabalho de Rayman *et al.* (1981) não levou em conta que a salmoura utilizada em produtos curados não é somente o sal de cura (nitrito), mas possui em torno de 13 componentes diferentes. Cada constituinte da salmoura deve ser melhor investigado separadamente. Emulsionantes mono e diglicerídeos, ácidos esteres glicerídeos e fosfolipídios que podem estar presentes na salmoura tem ação antagonista com a nisina (Herming *et al.* 1986). Outros fatores inerentes à formulação base de presunto, tais como nitrito de sódio, cloreto

de sódio e pH podem influenciar a multiplicação de *L. monocytogenes* (Karina *et al.*, 2011).

A ação do NaCl em concentrações de 2 a 6% (m/m) pode ter um efeito protetor e/ou ativador do gene de resistência da *L. monocytogenes* contra a nisina (Martinis, *et al.* 1998; Davies, *et al.* 1999 e Bergholz, *et al.* 2013).

Resultados da CMB demonstraram diferenças de sensibilidades da cepa ATCC e dos isolados de *L. monocytogenes*. Ribeiro *et al.* (2006) demonstraram que isolados de *L. monocytogenes* de ambientes estressantes para a bactéria, como a indústria alimentícia, podem apresentar maior resistência.

Weeks *et al.* (2006) sugeriram que a *L. monocytogenes* Scott A altera a sua estrutura de membrana de forma dependente, conforme estímulos ambientais (pH) e / ou moléculas de sinalização (*quorum sensing*). Ou seja, o *pool* teria sua susceptibilidade para a nisina diminuída, devido ao sinal instigado pelo pH ou *quorum*, provocando uma mudança reversível da membrana, resultando em um aumento da população.

No ensaio 1, presunto cozido com dosagem de nisina de 12,5 mg/kg contra um *pool* de *L. monocytogenes*, não demonstrou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle. Em vista disso, no ensaio 3 aumentou-se a dosagem da nisina para 32 mg/kg, de acordo com a média dos resultados dos isolados de *L. monocytogenes* do ensaio CMB.

No ensaio 3, a dosagem de 32 mg/kg demonstrou uma ação bacteriostática contra o *pool* de *L. monocytogenes*, aumentando a fase lag para 8 dias, (Figura 11) e contra a ATCC 7644, para 10 dias (Figura 12).

Resultados semelhantes foram obtidos em outros trabalhos (Zhang & Mustapha, 1999; Davies *et al.*, 1999; Ariyapitipun *et al.*, 2000; Ofré; Garrida; Aymerich, 2008; Kalschne *et al.*, 2014) apesar de que a eficiência da nisina aplicada diretamente em produtos cárneos apresenta limitações, devido aos fatores intrínsecos do alimento. Por exemplo, Beuchat *et al.* (1997) estudaram o efeito da nisina na sobrevivência e multiplicação de linhagens de *Bacillus cereus* psicrótrófos, em molho de carne. As células vegetativas estressadas pelo calor apresentaram maior sensibilidade à nisina. O efeito inibitório da nisina foi mais pronunciado a 8 °C em comparação a 15 °C. As células vegetativas apresentaram maior sensibilidade a nisina que os endósporos. A multiplicação de células

vegetativas e endósporos, após um período inicial de inibição, foi atribuído à perda de atividade da nisina.

Em salsichas cozidas tipo continental embalada a vácuo e armazenada sob refrigeração, a adição de 1,25 a 6,25 mg de nisina por Kg de produto, ou imersão da salsicha cozida em uma solução de 5,0 a 25,0 mg de nisina por litro, aumentou a vida útil do produto (Delves-Broughton, 2005).

No Brasil, Castro (2002) observou que a aplicação de uma solução de nisina a 200 mg/kg, em solução de ácido fosfórico grau alimentício (0,1% v/v), à superfície de salsichas, não foi eficiente na redução da população de micro-organismos mesófilos, bactérias láticas e micro-organismos psicotróficos nas salsichas armazenadas a 8 °C e a 12 °C. No entanto, a ação sobre *L. monocytogenes* variou de acordo com a temperatura de armazenamento das salsichas e com o grau de contaminação. Para contaminação com níveis entre 10^3 - 10^4 UFC/cm², a 8 °C, houve atividade antimicrobiana, mas para níveis de contaminação mais altos (10^6 ou 10^7 UFC/cm²), em temperaturas mais elevadas (12 °C), a nisina teve ação bastante limitada contra *L. monocytogenes*. Portanto, a ação da nisina contra *L. monocytogenes* em salsicha varia de acordo com a temperatura de armazenamento, nível de contaminação inicial e concentração de nisina aplicada.

Atualmente, a nisina é comercializada por diversas empresas, as quais demonstram em seu rótulo a quantidade de nisina na formulação. Considerando a importância da concentração de nisina adicionada ao produto para atingir uma adequada atividade antimicrobiana, diversas técnicas foram desenvolvidas.

Técnicas de ágar difusão, por exemplo, são métodos amplamente utilizados para determinação da concentração de nisina. No entanto, estes métodos são conhecidos por ter baixa sensibilidade devido à complexidade da matriz alimentar e precisam de um longo tempo para produção de culturas microbianas. (Pongtharangkul & Demirci 2004; Tramer & Fowler 1964), além de formarem, muitas vezes, zonas falsas de inibição por causa do pH baixo das amostras (Wolf & Gibbons, 1996).

Os métodos de imunoenaios são mais sensíveis do que as técnicas de difusão em ágar e bioensaios tradicionais (Falahee *et al.* 1990; Falahee and Adams 1992). No entanto, estes métodos requerem um longo período de tempo e tem tendência a provocar reações cruzadas com subtilisina (uma protease) (Falahee e Adams 1992; Saris Walstrom e 1992).

Neste trabalho, a concentração de nisina foi determinada por HPLC-DAD-MS afim de desenvolver um método de confiança para sua quantificação. O método confirmou a concentração de 2,5% de nisina no produto comercial Nisaplin® predito no laudo do fabricante e teve boa reprodutividade (Figura 16). O estabelecimento dessa metodologia e um passo muito importante para análise de nisina em presunto.

A concentração de nisina que foi eficaz para controlar a multiplicação de um *pool* de *L. monocytogenes* e uma cepa ATCC 7644 (Figura 14) em presunto cozido foi de 32 mg/kg. Bactérias lácticas deteriorantes de produtos cárneos também foram inibidas pelo antimicrobiano mesmo em menor concentração (12,5 mg/Kg), o que evitaria perdas pela indústria de alimentos (Calderon *et al.*, 1985; Collins-Thompson *et al.*, 1985; Cutter & Siragusa, 1998; Coventry, *et al.*, 1995; Nattress, *et al.*; Lemay *et al.* 2002; Gill & Holley, 2003; Ercolini *et al.* 2010; Kalschne *et al.*, 2014). O processo de cozimento utilizado na elaboração de presunto elimina a maioria dos micro-organismos que estejam na forma vegetativa, porém pode ocorrer recontaminação nas etapas de fatiamento e embalagem. Portanto, a utilização de nisina em produtos cárneos pode ser um fator importante para o aumento da qualidade e segurança desses produtos.

Para se estipular uma concentração de uso no presunto cozido deve-se levar em conta a formulação deste. Visto que diferentes quantidades de salmoura são empregadas na fabricação do presunto (até 100% do peso da carne) e esta, como foi demonstrada nesse trabalho, tem um efeito antagonista na ação da nisina. Para a definição de uma dosagem em âmbito nacional em presunto cozido seria necessário padronizar a produção e a formulação dos presuntos cozidos, assim como de outros produtos cárneos RTE curados. A utilização da nisina como um aditivo para inibir a *L. monocytogenes* deve ser controlada em virtude que a incapacidade de utilizar uma concentração que permita alcançar um efeito significativo coloca em risco não só de não inibir a multiplicação de *L. monocytogenes*, mas também de permitir que esta desenvolva resistência à nisina.

7. CONCLUSÃO

De acordo com resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que:

- A adição de 12,5 mg/kg de nisina ao presunto cozido fatiado, armazenado a 8 °C, foi eficaz para controlar a população de BAL, mantendo diferença significativa até o décimo dia comparado com o controle. Entretanto, essa concentração não foi eficaz para inibição de *L. monocytogenes* em presunto.
- Pôde-se constatar que diferentes cepas de *L. monocytogenes* apresentaram perfis de sensibilidade diferentes e que a união destas em um *pool* apresentou maior resistência, não relacionada a presença de uma cepa específica selvagem.
- Foi demonstrado que uma concentração de 32 mg/kg de nisina apresentou ação inibitória sobre um *pool* de *L. monocytogenes* e sobre uma cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644, por 10 dias, em presunto cozido com salmoura a 36% (m/m) do peso da carne.

8. REFERÊNCIAS

- Aasen IM, Markussen ST, Moretro T, Katla L, Axelsson, Naterstad K. 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int. J. Food Microbiol.* 87:35–43.
- Abee T, Krockel L, Hill C. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.*, 28 pp. 169–185
- Adzitey F, Huda N. 2010. *Listeria monocytogenes* in foods: Incidences and possible control measures. *African Journal of Microbiology Research*, v. 4, p. 2848-2855.
- Allison, DG, McBain, AJ, Gilbert P, Lappin-Scott H, Gilbert P, Wilson M, Roberts D. 2000. Microbial biofilms: problems of control. In: *Community Structure and Cooperation in Biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 310–327.
- Althaus, D., Lehner, A., Brisse, S., Maury, M., Tasara, T., & Stephan, R. 2014. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated during 2011e 2013 from human infections in Switzerland. *Foodborne Pathogens Disease*, 11, 753e758.
- Arauz LJ, Jozala AF, Mazzola PG, Vessoni Penna TC .2009. Nisin biotechnological production and application: A review. *Trends in Food Science and Technology*, Londres, v.20, p146-154.
- Ariyapitipun T, Mustapha A, Clarke Ad. 2000. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid, and nisin. *J Food Prot* 63:131–6.
- Arora DS, Kaur J.1999. Antimicrobial Activity of spices. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol 12, Issue 3, p 257-262.
- Aymerich MT, Jofré A, Garriga M, Hugas M. 2005. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. *J. Food Prot.* 68, 173–177.
- Autio T, Hielm S, Miettinen M, Sjoberg AM, Aarnisalo K, Bjorkroth J, et al.1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl Environ Microbiol.* 65: 150–155.
- Auvolat A, Besse NG. 2016. The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food. *Food Microbiology*, v-53, p.135 e 149.

- Barbuti S, Parolari G. 2002. Validation of manufacturing process to control pathogenic bacteria in typical dry fermented products. *Meat Science*, v.62, p.323-329.
- Bergholz TM, Tang S, Wiedmann M, Boor KJ. 2013. Nisin resistance of *Listeria monocytogenes* is increased by exposure to salt stress and is mediated via LiaR. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 5682 e 5688.
- Bille J, Blanc DS, Shimid H, Boubaker K, Baumgartner A, Siegrist HH, Tritten ML, Lienhard R, Berner D, Anderau R, Treboux M, Ducommun JM, Malinverni, R, Genné D, Erard P, Waespi U. 2006. Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005. *Eurosurveillance*, v.11, n.6, p.91-93, 2006. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=633>>. Acesso em 9 julho. 2016.
- Borch E, Kant-Muemansb ML, Blixt Y. 1996. Bacterial spoilage of meat products and cured meat. *International Journal of Food Microbiology*, v. 33, p. 103-120.
- Bouttefroy A, Mansour M, Linder M, Milliere J.2000. Inhibitory combinations of nisin, sodium chloride, and pH on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth by an experimental design approach. *International Journal of Food Microbiology* 54,109–115.
- Byelashov OA, Daskalov H, Geornaras I, Kendall PA, Belk KE, Scanga JA, Smith GC, Sofos JN. 2010. Reduction of *Listeria monocytogenes* on frankfurters treated with lactic acid solutions of various temperatures. *Food Microbiol* 27(6):783–90.
- Brasil, MAPA. Instrução Normativa nº 09, de 08 de abril de 2009. Institui os Procedimentos de Controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo.
- Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Autorização de uso de produto. AUP/DOI/DIPOA nº161/98 e AUP/DOI/DIPOA nº563/98, de 19/11/1998.
- Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria De Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Almôndega, de Apresuntado, de Fiambre, de Hamburguer, de Kibe, de Presunto Cozido e de Presunto. Diário Oficial da União, Brasília.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico de Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília.

- Breukink E, Ganz P, Kruijff B, Seelig J. 2000. Binding of nisin Z to bilayer vesicles as determined with isothermal titration calorimetry. *Biochemistry* 39:10247–10254.
- Breukink E, Kruijff B. 2006. Lipid II as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 321–332.
- Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F .2011 Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* 27:1017–1032.
- Brogden KA. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 238–50.
- Bula CJ, Bille J, Glauser MP.1995. An epidemic of foodborne listeriosis in western Switzerland: description of 57 cases involving adults. *Clinical Infectious Disease*, 20, 66 e 72.
- Cabedo L, Barrot, LPI, Canelles ATI.2008. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in ready-to-eat food in Catalonia, Spain. *J. Food Prot.* 71:855–859.
- Calderon C, Collins-Thompson DL, Osborne WR.1985. Shelf-life studies of vacuum-packaged bacon treated with nisin. *J. Food Prot.* 48:330-333.
- Casaburi A, Piombino P, Nychas G -J, Villani F, Ercolini D. 2015. Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiology*, 45, 83–102.
- Carpentier B & Cerf O. 2011. Review: persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 1–8.
- Casarin LS, Casarin FO, Brandelli A, Novello JCL, Ferreira SO, Tondo EC. 2016. Influence of free energy in the attachment of *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on the stainless steels AISI 304 and AISI 316. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie / Food Science + Technology*, v. 69, p. 131-138.
- Castro, AP. 2002. Sobrevivência de bactérias aeróbias mesófilas, psicrotróficas, bactérias lácticas e *Listeria monocytogenes* em salsichas submetidas a tratamento com nisina. Dissertação (Mestrado e Ciências dos Alimentos). São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- CFR. Code of Federal Regulations. 9 CFR 430.1. Definitions. Disponível em: <https://www.law.cornell.edu/cfr/text/9/430.1> Acesso em: 23 julho 2016.
- Chandrapati S, O'Sullivan, DJ.1998. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Biotechnology*, 63, 229 e 233.

- Chaillou S, Christieans S, Rivollier M, Lucquin I, Champomier-Vergès MC, Zagorec M. 2014. Quantification and efficiency of *Lactobacillus sakei* strain mixtures used as protective cultures in ground beef. *Meat Science*, 97(3), 332–338.
- Chaitiemwong N, Hazeleger WC, Beumer RR, Zwietering MH. 2014. Quantification of transfer of *Listeria monocytogenes* between cooked ham and slicing machine surfaces. *Food Control* 44, 177 e 184.
- Chung KT, Dickson JS, Crouse JD. 1989 Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1329–1333.
- Codex (Codex Alimentarius Commission). 2009. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/>> Acesso em: 10 julho 2016.
- Codex (Codex Alimentarius Commission). 2016. Use of nisin (ins 234) in food category 08.3.2 in general, and specifically in products conforming to the corresponding commodity standards. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/>> Acesso em: 10 julho 2016.
- Collins-Thompson D L, Calderon C, Usborne WR. 1985. Nisin sensitivity of lactic acid bacteria isolated from cured and fermented meat products. *J. Food Prot.* 48:668-670.
- Constant A Zimmermann KF. 2004, Self-employment dynamics across the business cycle: migrants versus natives, Technical report, Bonn: IZA.
- Cotter PD, Hill C, Ross R P. 2005 Bacteriocins : developing innate immunity for food. *Nature reviews microbiology*, v. 3, p. 777–788.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM.1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711–745.
- Coventry MJ, Muirhead K, Hickey MW. 1995 Partial characterisation of pediocin PO2 and comparison with nisin for biopreservation of meat products. *Food Microbiology*, 26, 133–145,
- Crandall AD, Montville TJ. 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 231e237.
- Cruz CD, Silvestre FA, Kinoshita EM, Landgraf M, Franco BDGM, Destro MT. 2008. Epidemiological Survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 2, p.375-383.
- Cuppet SL. 1994. Edible Coating as Carriers of food Additives, Fungicides and Natural Antagonistas. CRC Press. 392 pages.

- Cutter CN, Siragusa GR. 1998. Incorporation of nisin into a meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.* 27, 19–23.
- Dave D, Ghaly AE. 2011. Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: A critical review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, v. 6, n. 4, p. 486-510.
- Davidson PM, Sofos JN, Branen AL. 2005. Antimicrobials in food. 3rd ed. CRC Taylor & Francis Group Press. Food science and technology. Disponível em: < <http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Foods/Antimicrobials-in-Food.pdf>> Acesso em: 10 julho 2016.
- Davidson PM. 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds, p. 520–556. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington, D.C.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280 (5361), 295–298.
- Davies EA, Delves-Broughton J. 1999. Nisin, p. 191–198. In R. Robinson, C. Batt, and P. Patel (ed.), *Encyclopedia of food microbiology*. Academic Press Ltd., London.
- Davies EA, Milne CF, Bevis HE, Potter RW, Harris JM, Williams GC, Thomas L V, Delves-Broughton J. 1999. Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage. *J. Food Prot.* 62:1004–1010.
- De Martinis ECP, Alves VF, Franco BDM. 2002. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Reviews International*, n.18, p.191-208.
- De Vuyst L, Vandamme EJ. 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis subsp. Lactis*: Properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: De Vuyst, L.; Vandamme, E. J. (Org.). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: microbiology, genetics, and applications*. 1. ed. Londres, Inglaterra: Blackie Academic & Professional. p. 151–221.
- DeBarros JR. 2009. Aplicação de nisina em tripa natural para o controle de micro-organismos deteriorantes da salsicha. Dissertação (Engenharia de processos químicos e bioquímicos) Universidade Centro Universidade De Instituto Mauá De Tecnologia, SP. 63p
- Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058e1071.

- Degnan AJ, Yousef AE, Luchansky JB. 1992. Use of *Pediococcus acidilactici* to control *Listeria monocytogenes* in temperature-abused vacuum-packaged wieners. *J. Food Prot.* 55, 98–103.
- Delves-Broughton J, Blackburn RJ, Evans, Hugenholtz J. 1996 Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69:193-202.
- Delves-Broughton J. 2005. Nisin as food preservative. *Food Australia* v. 57, p.525-527,
- Desmazeaud M. 1997. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the hygienic quality of products. *Tecnologia Lactea Latinoamericana*, v.28, n.8, p.38-43.
- Devlieghere F, Vermereijn L, Debevere J. 2004. New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14, 273e285.
- Diep DB, Nes IF. 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curret Drug Targets*, v3, p107-122.
- Di Stefano , Avellone G, Bongiorno D, Cunsolo V, Muccilli V, Sforza S, Dossena A, Drahos L, Vékey K. 2012. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry for food analysis. *J Chromatogr A*.1259:74-85.
- Donlan RM & Costerton JW, 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167 e 193.
- Doulgeraki AI, Ercolini D, Villani F, Nychas GJ. 2012. E.Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 157, n. 2, p. 130–141.
- Dykes GA, Moorhead SM.2002. Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. *International Journal of Food Microbiology*, v.73, p.71-81.
- Economou T, Pournis N, Ntzimani A, Savvaidis IN. 2009. Nisin–EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. *Food Chemistry*, 114, 1470–1476,.
- Endrikat S, Gallagher D, Pouillot R, Hicks Quesenberry H, Labarre D, Schroeder CM, Kause J. 2011. A comparative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in prepackaged versus retail-sliced deli meat. *Journal of Food Protection*. 73(4):612–619.
- Ercolini D, Ferrocino I, La Storia A, Mauriello G, Gigli S, Mais P, Villani F. 2010 Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiology*; Vol.27(1), pp.137-143.

- European Food Safety Authority (EFSA). 2014. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. EFSA J. 9:2090.
- Falahee MB, Adams MR, Dale JW, Morris BA. 1990. An enzyme immunoassay for nisin. Int J Food Sci Tech 25:590–595.
- Falahee MB, Adams MR. 1992. Cross-reactivity of bacteriocins from lactic acid bacteria and lantibiotics in a nisin bioassay and ELISA. Lett Appl Microbiol 15:214–216.
- Fall PA, Pilet MF, Leduc F, Cardinal M, Duflos G, Guérin C, Leroi F. 2012. Sensory and physicochemical evolution of tropical cooked peeled shrimp inoculated by *Brochothrix thermosphacta* and *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 during storage at 8 °C. International Journal of Food Microbiology, 152(3), 82–90.
- FAO/WHO. 2013. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) NISIN. Disponível em: <<http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=572>>. Acesso em 16 agosto. 2016.
- Farber JM, Peterkin PI. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiological Reviews, v. 55, p. 476-511.
- FDA. 1988 Federal Register, Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. 21 CFR Part 184, Fed. Reg. 53:11247-11251.
- FDA. 2001 US Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. Agency Response Letter GRAS Notice N°. GRN 000065, April 20.
- Fowler GG, Gasson MJ. 1991. Antibiotics-nisin. In N. J. Russell, & G. W. Gold (Eds.), Food preservatives ed (pp.135e152). Glasgow, UK: Blackie & Son Ltd.
- Frazier Wc, Westhoff Dc. 1993. Microbiología de los alimentos. 4ed., Espanha:Editorial Acribia S. A., 681 p.
- FSANZ (Food Standards Australia New Zealand). 2007. Food Standards Australia New Zealand: Application A565 -Nisin- Extension of Use as a Food Disponível em: <<http://www.foodstandards.gov.au/standardsdevelopment/applications/applicationa565nisin3303.cfm2007>> acesso 5 de maio de 20016.
- FSIS (Food Safety and Inspection Service). 2012. Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services and Food Safety and Inspection Service, U.S. Department of Agriculture. Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Disponível em:

<http://www.fsis.usda.gov/shared/PDF/Controlling_LM_RTE_guideline_0912.pdf> acesso em 5 julho de 2016

- Gahan CG, Hill C. 2005. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. J. Appl. Microbiol. 98, 1345–1353
- Gálvez A, Abriouel H, López RL, Omar NB. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. International Journal of Food Microbiology, v.120, p. 51-70.
- Gálvez A, Abriouel H, López RL, Omar NB. 2006. Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, Spain. Volume 16, Issue 9, September 2006, Pages 1058–1071.
- Gandhi M, Chikindas ML. 2007. Review. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. International Journal of Food Microbiology, v. 113, p. 1–15.
- Gasanov DH, Philip MH. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes*: a review Uta. FEMS Microbiology Reviews 29.851–875
- Giaouris E, Heir E, Desvaux M, Hebraud M, Moretro T, Langsrud S, Doulgeraki A, Nychas GJ, Kacaniova M, Czaczyk K, Olmez H, Simoes M. 2015. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. Front. Microbiol. 6, 841.
- Gill AO, Holley RA. 2003 Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 °C. International Journal of Food Microbiology, Vol.80 (3), pp.251-259.
- Glass KA, Johnson EA 2004. Antagonistic effect of fat on the antibotulinal activity of food preservatives and fatty acids. Food Microbiology, 21, 675–682.
- Gombas DE, Chen Y, Clavero RS, Scott VN. (2003). Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. J. Food Prot., 66: 559-569.
- Gords LGM, Bennik MHJ. 1994. Bacteriocins for food preservation. International journal of food technology, Marketing, Packaging and Analysis. 45(11), 65-71
- Gormley FJ, Little CL, Grant KA, De Pinna E, McLauchlin J. 2010a) The microbiological safety of ready-to-eat specialty meats from markets and specialty food shops: a UK wide study with a focus on *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. Food Microbiol. 27:243–249.
- Gormley FJ, Little CL, Rawal N, Gillespie IA, Lebaigue S, Adak GK. (2010b). A 17-year review of foodborne outbreaks: describing the continuing decline in England and Wales (1992–2008). Epidemiol. Infect. 9:1–12.

- Gram L, Ravn L, Rasch M, Bruhn JB, Christensen AB, Givskov M. 2002. Food spoilage — interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), 79–97.
- Grau FH. 2001. Meat and Meat Products. In Moir, C.J. Spoilage of processed food: Causes and diagnosis. Food Microbiology Group of Australian Institute of Food Science and Technology (AIFST). 206-207 p.
- Haechler H, Marti G, Giannin P, Lehner A, Jost M, Beck J. 2013. Outbreak of listeriosis due to imported cooked ham, Switzerland 2011. *Eurosurveillance*, 18(18). Pag 204.
- Hain T, Hossain H, Chatterjee SS, Machata S, Volk U, Wagner S. 2007. Pathogenomics of *Listeria* spp.. *International Journal of Medical Microbiology* Volume 297, Issues 7–8, 12 Pages 541–557. Special issue: Pathogenomics
- Handa-Miya S, Kimura B, Takahashi H, Sato M, Ishikama T, Igarashi K, Fujii T. 2007 Nonsense-mutated *inlA* and *prfA* not widely distributed in *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat seafood products in Japan. *International Journal of Food Microbiology*, v. 117, p. 312 -318.
- Hayek SA, Ibrahim SA. 2013. Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, v 4, p 73-87.
- Herman C, Maguna FP, Garro AO, Castro EA. 2009. Effect of temperature, pH and NaCl on nisin activity against *Lactobacillus fructivorans*. *The Journal of the Argentine Chemical Society*, v. 97, n.2, p. 11-18.
- Hofer E, Reis CMF, Hofer CB. 2006. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 1, p. 32-37.
- Hofer E, Nascimento RS, Oliveira MA. 1998. Meningite por *Listeria monocytogenes*. 2006 Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, n. 2, p. 173-177,
- Hugas M, Garriga M, Aymerich MT, Monfort JM. 1995. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 322–330.
- Huis in 't Veld J. 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 1–18.
- Ingham SC, Borneman DL, An´e C, Ingham BH. 2010. Predicting growth-no growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged ready-to-eat meats *J Food Prot* 73(4):708–14.
- Jaber B, McGuire J, Ayres JW, Daeschel MA. 2000. Efficacy of the antimicrobial peptide nisin in emulsifying oil in water. *J. Food Sci.* 65:502–506.

- Jack RW, TAGG JR, RAY B.1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews*, v. 59, n. 2, p. 171–200.
- Jiang J, Xiong YL. 2015. Technologies and Mechanisms for Safety Control of Ready-to-eat Muscle Foods: An Updated Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55:13, 1886-1901
- Jofré A, Garriga M, Aymerich T. 2008. Inhibition of *Salmonella sp. Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. *Meat Science* v.78, p. 53-59.
- Juneja, V. 2012. Novel natural food antimicrobials. *Ann. Rev. Food Sci. Technol.* 3:381–403.
- Kalschne DL, Geitenes S, Veit MR, Sarmiento CP, Colla E. 2014. Growth inhibition of lactic acid bacteria in ham by nisin: A model approach. *Meat Science* 98, 744–752.
- Karina P, Julio C, Leda G, Noemi Z. 2011. Behavior of *Listeria monocytogenes* type1 355/98(85) in meat emulsions as affected by temperature, pH, water activity, fat and microbial preservatives. *Food Control*, 22 .pp. 1573–1581.
- Kaur G, Malik R K, Mishra SK, Singh TP, BhardwajA, Singroha G, et al. 2011. Nisin and class IIa bacteriocin resistance among *Listeria* and other foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 17, 197e205.
- Keskinen LA, Todd ECD, Ryser ET. 2008 Impact of bacterial stress and biofilm-forming ability on transfer of surface-dried *Listeria monocytogenes* during slicing of delicatessen meats. *International Journal of Food Microbiology*, v. 127, n.3, p. 298–304.
- Kim, Se-Kwon, wijesekara I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Fundactional Foods*. Vol2, issue 1. Pag 1-9.
- Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1e3), 39 e 85.
- Labadie J. 1999. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science*, 52(3), 299–305.
- Landgraf IM, Kobata AMM, Jakabi M, Kirshbaum CRA, Marchi CR. 1999 Surto de meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 58, n. 1, p. 63-67.
- Lemay Marie-Josée, Choquette J, Delaquis PJ, Gariépy, C, Rodrigue, Natalie S L. 2002. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.78(3), pp.217-226.

- Lin CM, Takeuchi K, Zhang L, Dohm CB, Meyer JD, Hall PA, et al. 2006. Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. J Food Protect. 69: 71–79.
- Luchansky JB, Call JE. 2004. Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. J. Food Prot. 67, 1017–1021.
- Malheiros PS, Daroit, DJ, Silveira, NP, Brandelli A. 2012. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. Food Microbiology, 27, 175e178.
- Malheiros PS, Sant'Anna V, Barbosa MS, Brandelli A, Franco BDGM. 2012 Effect Of Liposome-Encapsulated Nisin And Bacteriocin-Like Substance P34 On *Listeria Monocytogenes* Growth In Minas Frescal Cheese - International Journal Of Food Microbiology Volume 156, Issue 3.Pages 272–277.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) 2015. Anuário dos Programas de Controle de Alimentos de Origem Animal do DIPOA. Brasília. Vol1.
- Martinis ECP, Franco BDGM. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. International Journal of food Microbiology, v.42, p.119-126.
- Martins EA, Germano PML. 2011 *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification and serotyping. Food Control, v. 22, p. 297-302.
- Martin-Visscher LA, Yoganathan S, Sit CS, Lohans CT, Vederas JC. 2011. The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. FEMS Microbiol. Lett. 317:152–159.
- Mataragas M, Drosinos EH, Vaidanis A, Metaxopoulos I. 2006. Development of a Predictive Model for Spoilage of Cooked Cured Meat Products and Its Validation Under Constant and Dynamic Temperature Storage Conditions. Journal of Food Science, v. 71, n. 6, p. 157-167.
- McLauchlin J, Mitchellb RT, Smerdonc WJ, Jewelld K. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. International Journal of Food Microbiology Volume 92, Issue 1, 1 April 2004, Pages 15–33.
- Mellefont LA, McMeekin TA, Ross T. 2008. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. International Journal of Food Microbiology 121, 157–168.

- Mendonça KS, Michael GB, Von Laer AE, Menezes DB, Cardoso MRI, Da Silva WP. 2012. Genetic relatedness among *Listeria monocytogenes* isolated in foods and food production chain in southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Control*, Vol.28(1), pp.171-177.
- Ming X, Daeschel MA. 1995, Correlation of Cellular Phospholipid Content with Nisin Resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, v. 58, n. 4, p. 416–420.
- Ministério Da Saúde. Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996. Resolve aprovar a extensão de uso da nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12.5mg/kg (emenda elaborada pela CDI/MS). *Diário Oficial*, Brasília, 23 jan.p1070.
- Ministério Da Saúde. Portaria nº 34, de 13 de fevereiro de 1992. Concede a Extensão de uso do aditivo nisina, como conservador para produto requijão no limite máximo de 12,5mg/kg (emenda elaborada pela CDI/MS). *Diário Oficial*, Brasília, 14 fev.p.1839.
- Ministério Da Saúde. Portaria nº 6, de 14 de fevereiro de 1990. Autoriza a inclusão da tabela I, da resolução 4 do Conselho Nacional de Saúde de 24 de novembro de 1988 do aditivo nisina na classe dos conservadores para uso nos produtos alimentícios e dentro dos limites indicados (emenda elaborada pela CD/MS), Brasília, 16 fev. p.3244.
- Miyamotoa KN, Monteirob KM, Caumob KS, Lorenzattoa KR, Ferreira HB, Brandelli A. 2015. Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 exposed to a sublethal concentration of nisin. *Journal of Proteomics* 119. 230-237
- Montville TJ, Bruno ME. 1994 Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobials proteins. *Int. J. Food Microbiol.* 24:53–74.
- Montville TJ, Chen Y. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: Recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.50, p.511-519.
- Montville TJ, Kaiser A. 1993. Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins. In D. G. Hoover & L. R. Steenson (Eds.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria* New York: Academic Press. pag. 1–22.
- Montville TJ, Winkowski K. 1997. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington DC: ASM Press. pag. 557–577.

- Murray M, Richard JA. 1997. Comparative study of the antilisterial activity of nisin A and Pediocin AcH in fresh ground pork stored aerobically at 58C. J. Food Prot. 50:1534–1540.
- Nascimento MS, Moreno I, Kuaye AY. 2008. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. Brazilian Journal of Food Technology, v.11, p.120-127.
- Nattress FM, Yost CK, Baker LP. 2001 .Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. International journal of food microbiology. Vol:70 fasc:1 pág:111 -119.
- Nychas G, Skandamis P, Tassou C, Koutsoumanis K. 2008. Meat spoilage during distribution. Meat Science, 78(1–2), 77–89.
- Nielsen DS, Jacobsen T, Jespersen L, Koch AG, Arneborg N. 2008. Occurrence and growth of yeasts in processed meat products – Implications for potential spoilage. Meat Science, v. 80, n. 3, p. 919–926.
- Nielsen JW, Dickson JS, Crouse JD. 1990. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2142–2145.
- Nychas GJE, Skandamis PN, Tassou CC, Koutsoumanis KP. 2008. Meat spoilage during distribution. Meat Science, v. 78, n. 1-2, p. 77-89,
- Oscáris JC, Pisabarro AG. 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. International Microbiology, barcelona, V4, p13-19.
- Paiva AD, Breukink E, Mantovani HC. 2011. Role of lipid II and membrane thickness in the mechanism of action of the lantibiotic bovicin HC5. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 55, n. 11, p. 5284–93, nov. 2011.
- Pagedar A, Singh J, Batish VK .2012. Adaptation to benzalkonium chloride and ciprofloxacin affects biofilm formation potential, efflux pump and haemolysin activity of *Escherichia coli* of dairy origin. J Dairy Res 79:383–389.
- Papadopoulou OS, Chorianopoulos NG, Gkana EN, Grounta AV, Koutsoumanis KP, Nychas G-E .2012. Transfer of foodborne pathogenic bacteria to non-inoculated beef fillets through meat mincing machine. Meat Sci 90:865–869.
- Pellicer K, Copes J, Giannuzzi LJ, Zaritzky N.2011. Behavior of *Listeria monocytogenes* type1 355/98 (85) in meat emulsions as affected by temperature, pH, water activity, fat and microbial preservatives. Food Control, v. 22, n. 10, p.1573-1581.
- PHAC (Public Health Agency of Canada). (2009). *Listeria monocytogenes* outbreak. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/alert-alerte/listeria/listeria_2009-eng.php> Acesso 22 de agosto 2016.

- PHAC (Public Health Agency of Canada). 2010. Update to 2008 *Listeria monocytogenes* case numbers. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/alert-alerte/listeria/listeria_20100413-eng.php> Acesso 10 de agosto 2016.
- Quinto EJ, Jiménez P, Caro I, Tejero J, Mateo J, Girbés T. 2014. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. Food and Nutrition Sciences, Vol.5 No.18, 1765-1775.
- Pimentel Gomes F. 2009. Curso de estatística experimental. 15ª ed. Piracicaba – SP: Editora FEALQ. 451p.
- Pongtharangkul T, Demirci A. 2004 Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. Appl Environ Microbiol 65:268–272
- Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM. 2007. Listeria review of epidemiology and pathogenesis. Journal of Microbiology and Immunology Infection, v. 40, p.4-13.
- Rayman K, Malik N, Hurst A. 1983. Failure of nisin to inhibit growth of *Clostridium botulinum* in a model cured meat system. Appl. Environ. Microbiol. 46:1450–1452.
- Rayman MK, Aris B, Hurst V. 1981. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrate in the preservation of meat. Appl. Environ. Microbiol. 41:375-380.
- Reissbrodt R. 2004. New chromogenic plating media detection and enumeration of pathogenic *Listeria spp* – an overview. International Journal of Food Microbiology, v. 95, p.83-89.
- Reunanen J, Saris PE. 2004. J. Bioassay for nisin in sausage; a shelf life study of nisin in cooked sausage. Meat Science, v. 66, p. 515-518.
- Ribeiro AR. 2006. Resistência antimicrobiana em *Salmonella enterica subsp enterica* sorovar *Hadar* isoladas de carcaças de frango. Arquivos do Instituto Biológico, v. 73, n 3, 357-360.
- Richardson KC. 2001. Preservation of foods Relying mainly on chilling . In Moir, C.J. Spoilage of processed food: Causes and diagnosis. Food Microbiology Group of Australian Institute of Food Science and Technology (AIFST). 25 p.
- Roche SM, Kerouanton A, Minet J, Le Monnier A, Brisabois A, Velge P. 2009. Prevalence of low-virulence *Listeria monocytogenes* strains from different foods and environments. International Journal of Food Microbiology 130, 151–155.
- Rocourt J. 1996. Risk factors for listeriosis. Food Control, v. 7, p. 194-203.

- Romby P, Vandenesch F, Wagner EGH. 2006. The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression. *Current Opinion in Microbiology*, v. 9, p. 229-236.
- Rose NL, Sporns P, Dodd HM, Gasson MJ, Mellon FA, McMullen LM. 2003. Involvement of dehydroalanine and dehydrobutyrine in the addition of glutathione to nisin. *J. Agric. Food Chem.* 51:3174–3178.
- Samelis J, Bedie GK, Sofos JN, Belk KE, Scanga JA, Smith GC. 2005. 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 (LWT)*, v.38, p.21-28.
- Sampaio IBM. 2002. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2ª.ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 265p.
- Sauders BD, Overdeest J, Fortes E, Windham K, Schukken Y, Lembo A, Wiedmann M. 2012. *Appl Environ Microbiol.* Jun;78(12):4420-33
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. 2011. Foodborne illness acquired in the United Statesmajor pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (1), 7e15.
- Schaik WV, Abee T. 2005. The role of σ B bacteria-targets for food preservation in the stress response of Gram-positive and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16, p. 218-224,.
- Schwab JP, Edelweiss MIA. 2003 Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunoistoquímica. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 2, p. 111-114.
- Seman DL, Borger AC, Meyer JD, Hall PA, Milkowski AL. 2002. 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 *J. Food. Prot.* 65(4):651–8.
- Senczek D, Stephan R, Untermann F .2000. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 155e159.
- Sleator RD, Clifford T, Hill CG. 2007. Osmolarity: a key environmental cue initiating the gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *Medical Hypotheses*, v. 69, p. 1090-1092.
- Sleator RD, Watson D, Hill C, Gahan CGM. 2009. The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract. *Microbiology* Vol.155(Pt 8), pp.2463-75.

- Smith L. et al. 2008. Elucidation of the antimicrobial mechanism of mutacin 1140. *Biochemistry*, v. 47, n. 10, p. 3308–14, 11.
- Sofos JN, Geornaras I. 2010. Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*, v. 86, n. 1, p. 2-14.
- Sommers EB, Taylor SL, Doyle MP. 1986 Nisin does not inhibit the growth of *Listeria monocytogenes*, Annual Report. Food Research Institute. University of Wisconsin. Madison, Wis. p. 369.
- Stephan R, Althaus D, Kiefer S, Lehner A, Hatz C, Schmutz C. 2015. Foodborne transmission of *Listeria monocytogenes* via ready-to-eat salad: a nationwide outbreak in Switzerland, 2013-2014. *Food Control*, 57, 14e17.
- Suihko, ML, Salo S, Niclasen O, Gudbjörnsdóttir B, Torkelsson G, Bredholt S, Sjöberg AM, Gustavsson P. 2002. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from the meat, poultry and seafood industries by automated ribotyping. *International Journal of Food Microbiology*, v. 72, n. 1-2, p.137-46.
- Sung SY, Sin LT, Tee TT, Bee ST, Rahmat AR, Rahman WAWA, Tan AC, Vikhraman M. 2013. Antimicrobial agents for food packaging applications *Trends in Food Science & Technology*, Vol.33 (2), pp.110-123.
- Swaminathan B, Gerner-Smidt P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, v.9, n.10, p.1236-1243.
- Tompkin RB. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J Food Prot* 65(4):709–25.
- Thomas LV, Clarkson MR, Delves-Broughton J. 2000. Nisin. In: Naidu AS (ed) *Natural food antimicrobial systems* (pp 463–524). CRC. Press, Boca Raton, USA, CRC Press
- Todd ECD, Notermans S. 2011. Survival of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 22, 1484 e 1490.
- U.S. Food And Drug Administration. 1998. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Fed. Regist.* 53:11247.
- U.S. Food And Drug Administration. 2008. Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as direct human food ingredient. Code of Federal Regulation 21CFR184.1538d. Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration, Washington, DC.
- Vasilopoulos C, De Mey E, Dewulf L, Paelinck H, De Smedt, A, Vandendriessche F, Leroy F. 2010. Interactions between bacterial isolates from modified-

- atmosphere packaged artisan-type cooked ham in view of the development of a bioprotective culture. *Food Microbiology*, 27(8), 1086–1094.
- Verheul A. et al. 1997. Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Applied and environmental microbiology*, v. 63, n. 9, p. 3451–3457.
- Vieira S Hoffmann R. 1989. *Estatística experimental*. São Paulo: Atlas. 175p.
- Von Laer AE, Lima AS, Trindade OS, Andriquetto C, Destro M, Silva, W.P. 2009. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in Pelotas-RS by PFGE. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40, n.3.
- Von Wright A, Axelsson L. 2012. Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S. and von Wright, A., Eds., *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 4th Edition, Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, Boca Raton, 1-16.
- Werbrouck H, Botteldoorn N, Uyttendaele M, Herman L, Coillie EV. 2006. Quantification of gene expression of *Listeria monocytogenes* by real-time reverse transcription PCR: Optimization, evaluation and pitfalls. *Journal of Microbiological Methods*, v. 69, p. 306-314.
- Werbrouck H, Botteldoorn N, Ceelen L, Decostere A, Uyttendaele M, Herman L, Coillie EV. 2008 Characterization of virulence properties of *Listeria monocytogenes* serotypes 4b strains of different origins. *Zoonoses Public Health*, v. 55, p. 242-248.
- Wiedemann I. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.* 276 (3), 1772– 1779.
- Wolf CE, Gibbons WR .1996. Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. *J Appl Bacteriol* 80:453–457.
- World Health Organization (WHO) .2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. In: *Microbiological Risk Assessment Series 5*. Technical Report. World Health Organization, Rome.
- Zhang S, Mustapha A. 1999. Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 numbers on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin or nisin combined with EDTA. *J Food Prot* 62: 1123–7.
- Zimmermann, FJP. 2004. *Estatística aplicada à pesquisa agrícola*. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 402p.
- Zouhir A, Hammami R, Fliss I, Hamida J. 2010. A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. *Protein J* 29:432–439.