UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Atividade de antimicrobianos comerciais no controle de *Listeria*
monocytogenes em mortadela e salsicha**

Isabela Sarmento Brasileiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de mestre em Ciências dos Alimentos.

Orientador:

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

São Paulo

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Atividade de antimicrobianos comerciais no controle de *Listeria*
monocytogenes em mortadela e salsicha**

Isabela Sarmento Brasileiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de mestre em Ciências dos Alimentos.

Orientador:

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Brasileiro, Isabela Sarmiento
B823a Atividade de antimicrobianos comerciais no controle de *Listeria monocytogenes* em mortadela e salsicha / Isabela Sarmiento Brasileiro. -- São Paulo, 2014.
69p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo

1. Microbiologia de alimentos I. T. II. Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo, orientador.

664.07 CDD

Isabela Sarmento Brasileiro

**Atividade de antimicrobianos comerciais no controle de *Listeria*
monocytogenes em mortadela e salsicha**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do grau de
mestre em Ciências dos Alimentos.

Orientador:

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

São Paulo

2014

Isabela Sarmento Brasileiro

**Atividade de antimicrobianos comerciais no controle de *Listeria*
monocytogenes em mortadela e salsicha**

Comissão julgadora
da
dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Orientador/Presidente

1 examinador

2 examinador

São Paulo, março de 2014.

**Aos meus pais, por me apoiarem em
minhas decisões, pela amizade e
por serem meu exemplo de
vida.**

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Bernadette D. G. M. Franco, pela orientação, confiança e oportunidade que me proporcionou durante esses anos. Por contribuir para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Matheus Barbosa e Maria Crystina Igarashi pela ajuda indispensável nas realizações dos experimentos, pela companhia até tarde da noite no laboratório e amizade.

À Prof. Maria Teresa Destro pela oportunidade de aprendizado, atenção e críticas durante a qualificação.

À Prof. Mariza Landgraf pelo convívio e ensinamentos durante o mestrado.

À Prof. Dra. Cynthia J. Kunigk e a Dra. Ivone Delazari pelas sugestões e críticas realizadas durante a banca de qualificação.

À Vanessa Bíscola pela ajuda durante a finalização da dissertação.

Aos colegas de laboratório, Matheus, Maria Crystina, Patrícia, Aline, Vanessa, Janaína, Vinícius, Rafael, Maria Fernanda, Daniela, Fabiana, Erika, Slavi, Diogo e Martha pela companhia, pelos bons momentos de descontração e trabalho no laboratório.

Às funcionárias do laboratório Kátia e Lúcia, pelo auxílio nos experimentos, pela companhia e pela paciência.

Aos funcionários da secretária de Pós-Graduação e da secretaria do departamento pelo auxílio e colaboração sempre que necessário.

À Dupont Ltda. pelo fornecimento dos antimicrobianos e mortadela usados no trabalho e por todo auxílio durante os experimentos.

A Kienast & Kratschmer Ltda. por disponibilizar a planta piloto para fabricação das salsichas, fornecimento dos antimicrobianos e pela ajuda sempre que necessário.

À minha família: meu pai Isácio, minha mãe Rosana e irmão Thiago pelo constante apoio em tudo que realizo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> em produtos cárneos.....	3
1.2 Microrganismos deteriorantes em produtos cárneos.....	4
1.3 Compostos antimicrobianos para controle de <i>L. monocytogenes</i> em produtos cárneos.....	5
1.3.1 Lactato de sódio.....	6
1.3.2 Nisina.....	7
1.3.3 Fumaça líquida.....	8
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Antimicrobianos utilizados no estudo.....	12
3.1.1 Produto A.....	12
3.1.2 Produto B.....	12
3.1.3 Lactato de sódio.....	12
3.1.4 Fumaça líquida.....	13
3.2 Fabricação de mortadela.....	13
3.3 Fabricação de salsichas <i>hot-dog</i>.....	16
3.4 Contaminação experimental das fatias de mortadelas e salsichas....	20
3.4.1 Preparo do inóculo de <i>L. monocytogenes</i>	20
3.4.2 Contaminação experimental das fatias de mortadela.....	20
3.4.3 Contaminação experimental das salsichas.....	22
3.5 Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> nas fatias de mortadela e nas salsichas.....	23
3.6 Contagem de Bactérias Lácticas, bolores e leveduras na salsichas	23

<i>hot-dog</i>	
3.7 Determinação do pH e Aw da mortadela e salsichas.....	24
3.8 Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Atividade do lactato de sódio e dos produtos A e B contra <i>Listeria monocytogenes</i> em mortadela fatiada, durante armazenamento a 8 °C.	25
4.2 Atividade da fumaça líquida e lactato de sódio contra <i>Listeria monocytogenes</i> , bactérias lácticas, bolores e levedura, em salsichas <i>hot-dog</i> , durante armazenamento a 8°C.....	30
4.3 pH e Aw das amostras de mortadela e salsichas <i>hot-dog</i> , armazenados a 8°C, ao longo do tempo de prateleira.....	37
5. CONCLUSÕES.....	43
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de fatiamento da mortadela.....	15
Figura 2 - Embalagens contendo as fatias de mortadela nos recipientes com gelo reciclável. Etapa pré-contaminação.....	15
Figura 3 - Homogeneização dos ingredientes para fabricação das salsichas <i>hot-dog</i>	16
Figura 4 - Embutimento da emulsão cárnea em tripa de celulose.....	17
Figura 5 - Estufa para cozimento das salsichas.....	17
Figura 6 - Imersão na solução de corante de urucum (5%) (A) e na solução de ácido fosfórico (0,2%) (B).....	18
Figura 7 - Salsichas na câmara fria (8 °C) para secagem.....	19
Figura 8 - Embalagem a vácuo das fatias de mortadela experimentalmente contaminadas com <i>L. monocytogenes</i>	21
Figura 9 - Refrigeração das fatias de mortadela experimentalmente contaminadas com <i>L. monocytogenes</i>	21
Figura 10 - Salsichas experimentalmente contaminadas com <i>L. monocytogenes</i> embaladas a vácuo.....	22
Figura 11 – Contagens de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/g) em mortadela fatiada embalada a vácuo contendo lactato de sódio (vermelho), produto A (verde), produto B (roxo) e controle (azul) durante armazenamento a 8°C por 24 horas....	25
Figura 12 – Contagens de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/g) em mortadela fatiada embalada a vácuo com adição de lactato de sódio (vermelho), produto A (verde), produto B (roxo) e controle (azul) durante armazenamento a 8°C por 30 dias.....	26
Figura 13 – Contagens de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/g) em mortadela fatiada embalada a vácuo com adição de extrato de alecrim (1a) (vermelho), nisina livre (2a) (verde), nisina encapsulada (3a) (roxo), nisina livre + nisina encapsulada (4a) (azul), nisina livre na mesma concentração de 4B (5a) (laranja) e sem adição de antimicrobiano (6a) (preto) durante armazenamento a 8°C por 24 horas.....	27

Figura 14 – Contagens de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/g) em mortadela fatiada embalada a vácuo com adição de extrato de alecrim (1a) (vermelho), nisina livre (2a) (verde), nisina encapsulada (3a) (roxo), nisina livre + nisina encapsulada (4a) (azul), nisina livre na mesma concentração de 4B (5a) (laranja) e sem adição de antimicrobiano (6a) (preto) durante armazenamento a 8 °C por 30 dias.....	28
Figura 15 – Contagens de <i>L. monocytogenes</i> (logUFC/g) em salsicha embalada a vácuo formulada com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida + lactato de sódio (roxo) e controle (azul) durante armazenamento a 8 °C por 28 dias.....	31
Figura 16 – Contagens de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/g) em salsicha embalada a vácuo formulada com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida + lactato de sódio (roxo) e controle (azul) durante armazenamento a 8°C por 28 dias.....	31
Figura 17 – Contagens de bolor e levedura (log UFC/g) em salsicha embalada a vácuo formulada com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida + lactato de sódio (roxo) e controle (azul) durante armazenamento a 8°C por 48 horas.....	33
Figura 18 – Contagens de bolor e levedura (log UFC/g) em salsicha embalada a vácuo formulada com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida + lactato de sódio (roxo) e controle (azul) durante armazenamento a 8°C por 28 dias.....	33
Figura 19 – Valores de pH de mortadela fatiada embalada a vácuo com adição de lactato de sódio (vermelho), produto A (verde), produto B (roxo) e controle (azul) durante armazenamento a 8 °C por 30 dias. Primeiro lote.....	37
Figura 20 – Valores de pH de mortadela fatiada embalada a vácuo com adição de extrato de alecrim (1A) (vermelho), nisina livre (2A) (verde), nisina encapsulada (3A) (roxo), nisina livre + nisina encapsulada (4A) (azul), nisina livre na mesma concentração de 4B (5A) (laranja) e sem adição de antimicrobiano (6A) (preto) durante armazenamento a 8°C até 30 dias. Segundo lote.....	38

Figura 21 – Valores de A_w de mortadela fatiada embalada a vácuo com adição de lactato de sódio (vermelho), produto A (verde), produto B (roxo) e controle (azul) durante armazenamento a 8°C por 30 dias. Primeiro lote.....	38
Figura 22 – Valores de A_w de mortadela fatiada embalada a vácuo com adição de extrato de alecrim (1A) (vermelho), nisina livre (2A) (verde), nisina encapsulada (3A) (roxo), nisina livre + nisina encapsulada (4A) (azul), nisina livre na mesma concentração de 4B (5A) (laranja) e sem adição de antimicrobiano (6A) (preto) durante armazenamento a 8°C até 30 dias. Segundo lote.....	39
Figura 23 – Valores de pH de salsicha embalada a vácuo formulada com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida e lactato de sódio (roxo) e controle (azul) durante armazenamento a 8°C por 28 dias. Primeiro lote.....	40
Figura 24 – Valores de pH de salsicha embalada a vácuo formulada com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida e lactato de sódio (roxo) e controle (azul) durante armazenamento a 8°C por 28 dias. Segundo lote.....	40
Figura 25 – Valores de A_w de salsicha embalada a vácuo formulada com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida e lactato de sódio (roxo) e controle (azul) durante armazenamento a 8°C por 28 dias. Primeiro lote.....	41
Figura 26 – Valores de A_w de salsicha embalada a vácuo formulada com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida e lactato de sódio (roxo) e controle (azul) durante armazenamento a 8°C por 28 dias. Segundo lote.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Contagens de bactérias lácticas (log UFC/g) nas salsichas formuladas com e sem lactato de sódio, imersas e não imersas em fumaça líquida, durante armazenamento a 8 °C.....	35
---	----

RESUMO

BRASILEIRO, I.S. **Atividade de antimicrobianos comerciais no controle de *Listeria monocytogenes* em mortadela e salsicha.** Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

Os produtos cárneos prontos para consumo estão entre os principais alimentos associados a surtos de listeriose, uma doença causada por *Listeria monocytogenes*. Este estudo objetivou avaliar a ação antimicrobiana do lactato de sódio e de duas formulações comerciais à base de nisina (produtos A e B) em mortadela, e do lactato de sódio e fumaça líquida em salsicha, experimentalmente contaminadas com um *pool* de seis cepas de *L. monocytogenes*, durante o armazenamento à vácuo à 8 °C. Os aditivos com melhor atividade anti-*Listeria* também foram avaliados quanto ao controle de bactérias lácticas (BAL) e bolores e leveduras em produto cárneo, durante o armazenamento à 8 °C. O produto A é uma mistura de nisina encapsulada, nisina livre e extrato de alecrim, enquanto o produto B é uma mistura de nisina livre e extrato de alecrim. *L. monocytogenes* foi capaz de se multiplicar em todas as formulações de mortadela ao longo do período de armazenamento. Entretanto, o produto A exerceu efeito antimicrobiano contra este patógeno. Após 10 dias de armazenamento, as contagens de *L. monocytogenes* nas mortadelas formuladas com o produto A foram 3 log UFC/g inferiores às contagens observadas nas demais formulações avaliadas (produto B, lactato de sódio e controle), além disso, o produto A foi capaz de reduzir a velocidade de multiplicação deste microrganismo. Em relação às salsichas tratadas com fumaça líquida, as contagens de *L. monocytogenes*, no oitavo dia de armazenamento foram 3 log UFC/g inferiores às contagens de *L. monocytogenes* nas salsichas formuladas com lactato de sódio e controle. Ao final do período de armazenamento (28 dias) observou-se diferença de 2 log UFC/g nas contagens de *L. monocytogenes* entre as salsichas formuladas com lactato de sódio + fumaça líquida e as demais formulações. A fumaça líquida foi capaz de inibir a multiplicação de bolores e leveduras por 21 dias de armazenamento, observando-se diferença de 2 log UFC/g entre as contagens observadas nas salsichas imersas em fumaça líquida e não imersas. As contagens de BAL permaneceram baixas ao longo do período de armazenamento (< 2 log UFC/g). Também não foi observada alteração nos valores de pH e atividade de água dos produtos cárneos, o que permite concluir que as diferenças observadas nas contagens de *L. monocytogenes* e bolores e leveduras são devidas à ação dos antimicrobianos adicionados aos produtos cárneos. A partir destes resultados é possível concluir que o produto A e a fumaça líquida são uma barreira adicional para o controle de *L. monocytogenes* em mortadela e salsichas, respectivamente, durante armazenamento a 8°C.

Palavras chave: *Listeria monocytogenes*, salsicha, mortadela, nisina, fumaça líquida.

ABSTRACT

BRASILEIRO, I.S. **Activity of commercial antimicrobials in the control of *L. monocytogenes* in bologna and frankfurters.** Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

Ready-to-eat meat products are among the foods most frequently associated to outbreaks of listeriosis, a disease caused by *Listeria monocytogenes*. The objective of the present study was to evaluate the antimicrobial activity of sodium lactate and two nisin-based commercial products (A and B) in bologna, and sodium lactate and liquid smoke in frankfurters, experimentally contaminated with a pool of six strains of *L. monocytogenes*, during storage at 8 °C under vacuum. The antimicrobial with better activity against *L. monocytogenes* was also evaluated against yeasts and molds and lactic acid bacteria. Product A is a mixture of encapsulated nisin, free nisin and rosemary extract, and product B is a mixture of free nisin and rosemary extract. *L. monocytogenes* was able to grow in all bologna formulations during storage. However, product A was capable of reducing the growth rate of the microorganism. Besides, *L. monocytogenes* populations in bologna formulated with product A were 3 log CFU/g lower than the population observed for control samples, after 10 days of storage at 8 °C. Regarding frankfurter samples, the use of liquid smoke alone or in combination with sodium lactate resulted in a 3 log CFU/g difference between *L. monocytogenes* counts found in control and treated samples, after 8 days of storage at 8 °C. However, after 28 days only the samples treated with liquid smoke combined with sodium lactate presented lower counts than controls (2 log CFU/g). Liquid smoke was also able to inhibit the growth of yeasts and molds in frankfurters, for 21 days of storage at 8 °C. Low counts of lactic acid bacteria (< 2 log CFU/g) were detected in frankfurters during the storage. There was no variation on pH and water activity values in the meat products during storage period; therefore, the differences found in counts of *L. monocytogenes* in the meat products can be attributed to the presence of the antimicrobials added in the formulations. Hence, product A and liquid smoke appear to be an additional barrier to control *L. monocytogenes* in bologna and frankfurters, respectively, during storage at 8 °C.

Key words: *Listeria monocytogenes*, frankfurters, bologna, nisin, liquid smoke.

1. INTRODUÇÃO

Pesquisas realizadas no Brasil e em outras partes do mundo apontam para uma mudança no padrão alimentar da população, com aumento do consumo de alimentos industrializados em virtude de diversos fatores econômicos, sociais e crescente urbanização das cidades (Andrade et al., 2010; Monteiro et al., 2011). Ao buscar alimentos industrializados, o consumidor espera encontrar, além da praticidade, um alimento que seja nutricionalmente satisfatório, saboroso, seguro para sua saúde, armazenável por longos períodos e que possua preço acessível (Andrade & Macedo, 1996).

Para reduzir a taxa de multiplicação de microrganismos e atender a demanda dos consumidores por alimentos seguros e com longa vida de prateleira, é importante atentar para a cadeia do frio (Rantsiou et al., 2011). No Brasil, por exemplo, exige-se que a elaboração de produtos cárneos industrializados, como produtos de salsicharia, presuntaria, fatiados e embalados por sistema à vácuo, seja realizada em salas climatizadas com temperatura inferior à 16° C (MAPA, Portaria 711/95),

A multiplicação de microrganismos em alimentos é influenciada por fatores intrínsecos (valor de pH, atividade de água (A_w) e composição química dos alimentos), fatores extrínsecos (temperatura de armazenamento e embalagem), tipo de processamento (pasteurização, irradiação e outros métodos de conservação aplicados em alimentos) e fatores implícitos (interações entre os microrganismos). O fator extrínseco que mais afeta a vida de prateleira de alimentos perecíveis é o armazenamento em temperatura de abuso (Cole, 2001). Alguns trabalhos relatam que existe grande variação na temperatura de alimentos resfriados durante o transporte, nos estabelecimentos comerciais e nos domicílios. Temperaturas de armazenamento inadequadas podem aumentar a velocidade de multiplicação de microrganismos patogênicos, colocando em risco a saúde do consumidor (Nychas et al., 2008; Gormley et al., 2010).

Embora a temperatura ótima para multiplicação de bactérias psicrotróficas varie entre 25 °C e 30 °C, este grupo de bactérias também é capaz de se multiplicar em temperatura de refrigeração. Estão incluídas neste grupo bactérias causadoras de deterioração de alimentos, como bactérias lácticas, *Brochothrix thermosphacta* e *Pseudomonas* spp. e bactérias patogênicas, como *Listeria monocytogenes* e *Vibrio parahaemolyticus* (Richardson, 2001).

Apesar do conhecimento adquirido em relação à segurança dos alimentos, o controle de patógenos durante todo processo produtivo ainda é um desafio (Rantsiou et al., 2011). No ano de 2012, segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica, ocorreram 10.836 casos de doenças transmitidas por alimentos no Estado de São Paulo (São Paulo, 2013). Esses dados evidenciam a importância de buscar novas formas para aumentar a segurança dos alimentos.

Neste contexto, merecem destaque os embutidos cárneos prontos para consumo, como salsichas e mortadelas, frequentemente associados à contaminação por *L. monocytogenes*. Embutidos cárneos são definidos, segundo o artigo 412 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), como “todo produto elaborado com carne ou órgãos comestíveis curados ou não, condimentado, cozido ou não, defumado e dessecado ou não, tendo como envoltório tripa, bexiga ou outra membrana animal, sendo permitido o emprego de películas artificiais no preparo de embutidos, desde que aprovadas pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA)”.

A fabricação de embutidos propicia aumento da vida de prateleira das carnes, diversificando a oferta de seus derivados e atendendo às demandas dos consumidores por terem custo menor e serem fáceis de preparar. Contudo, como estes alimentos não precisam ser cozidos antes de serem consumidos, é extremamente importante mantê-los na temperatura de armazenamento recomendada pelo fabricante, visando diminuir a velocidade de multiplicação dos microrganismos (Sofos & Geornaras, 2010).

A contaminação de embutidos cárneos prontos para consumo por *L. monocytogenes* pode ocorrer em todas as etapas de produção, porém o perigo se torna mais relevante quando esta contaminação ocorre nas etapas pós-processamento, posteriores ao tratamento térmico, como embalagem e fatiamento (Anonymous, 2006). Para reduzir este risco de contaminação, a indústria de alimentos deve adotar as Boas Práticas de Fabricação (BPF), que são condicionantes para a implantação de programas de gestão da segurança dos alimentos, como o *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP) (Roberto et al., 2006).

Para melhorar a segurança de embutidos cárneos, além da utilização de baixas temperaturas e da adoção de BPF e HACCP, é possível utilizar produtos com ação antibacteriana como barreira adicional. Vários produtos com o status de *Generally Recognized as Safe* (GRAS), como lactatos de sódio e potássio (Bloukas et al., 1997; Lin & Lin 2002; Choi & Chin 2003) fumaça líquida (Guilbaud et al., 2008; Martin et al., 2010) e

nisina (Wang et al., 2000; Reunanen & Saris 2004) são utilizados na indústria de alimentos para melhorar suas características microbiológicas.

1.1 *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos.

Listeria monocytogenes é um microrganismo frequentemente encontrado no solo, água, fezes e silagem. É um bacilo Gram-positivo, não formador de esporo, anaeróbio facultativo, móvel devido à presença de flagelos peritríquios e apresenta reação positiva para catalase e negativa para oxidase (Forsythe, 2005).

L. monocytogenes foi reconhecida como patógeno de importância veterinária em 1926 e como agente da listeriose humana em 1929. Apenas na década de 80 foi reconhecida como agente causador de doenças transmitidas por alimentos, após ocorrência de surtos na América do Norte e Europa (Germano, 2008; Farber & Peterkin, 1991). A listeriose é uma doença que acomete principalmente pessoas imunocomprometidas, mulheres grávidas, recém-nascidos e idosos. A infecção por *L. monocytogenes* pode levar à meningite, encefalite, septicemia e aborto ou parto prematuro em mulheres grávidas (Farber & Peterkin, 1991).

Apesar da baixa incidência, a listeriose é de grande importância para a saúde pública devido ao seu alto índice de mortalidade (20% a 30%) (Mead et al., 1999; Gerner-Smidt et al., 2005; Doorduyn et al., 2006). Nos Estados Unidos, de acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), estima-se que 1600 pessoas são infectadas anualmente por *L. monocytogenes* pelo consumo de alimentos contaminados, ocasionando a morte de aproximadamente 260 pessoas. Nos anos de 2013, 2012 e 2011, os surtos de listeriose divulgados pelo CDC foram associados ao consumo de queijo, salada de ricota e melão, contaminados por *L. monocytogenes*. Apesar de estar envolvido em somente 0,04% das enfermidades veiculadas por alimentos, este patógeno é responsável por 29% de todas as mortes causadas por infecção alimentar de origem bacteriana (Scallan et al., 2011).

Os alimentos frequentemente associados a surtos de listeriose são os queijos frescos e os produtos cárneos, principalmente aqueles "prontos para consumo" como salsichas e patês, sendo responsáveis por mais de 90% dos casos (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

No Brasil, o patógeno foi encontrado com frequência em 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). Os casos confirmados de listeriose no país, associados à meningite, aborto, septicemia e material abortado, não puderam ser relacionados ao consumo de alimentos contaminados devido à complexidade epidemiológica da doença (Hofer et al., 1998, Landgraf et al., 1999, Schwab e Edelweiss, 2003, Hofer, 2006). Gandhi & Chikindas (2007) citam o longo período de incubação da listeriose como fator que dificulta a identificação do patógeno e o rastreamento do alimento contaminado.

Algumas características deste patógeno, tais como capacidade de sobreviver em ampla faixa de temperatura (0 a 45° C) e pH (4,4 a 9,4), Aw acima de 0,92, concentrações de sal acima de 10% e de formar biofilmes, dificultam o controle de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento de alimentos (Zhu et al., 2005).

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 àquele ambiente. Além disso, as mesmas cepas encontradas nos produtos cárneos foram identificadas no ambiente de processamento, indicando contaminação cruzada.

Em alimentos cozidos prontos para consumo, a baixa incidência de microrganismos competidores e a longa vida de prateleira favorecem a multiplicação de *L. monocytogenes*, por isso 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.

Além de buscar por alternativas que minimizem a incidência deste importante patógeno em alimentos prontos para consumo, é relevante para a indústria de alimentos e para o consumidor buscar alternativas que minimizem sua deterioração. O alimento deteriorado não é, necessariamente, um perigo ao consumidor. No entanto, devido à grande perda econômica, ocasionada pela queda na confiança do consumidor e pelo descarte dos alimentos deteriorados, busca-se mecanismos para minimizar a deterioração (Nychas et al., 2008).

1.2 Microrganismos deteriorantes em produtos cárneos

Define-se alimento deteriorado como aquele que sofreu alterações que o tornaram impróprios para o consumo humano. As alterações podem ocorrer devido a lesões físicas, modificações bioquímicas e desenvolvimento microbiano (Nychas et al., 2008).

Condições inadequadas de higiene dos manipuladores e do ambiente favorecem a contaminação dos alimentos por microrganismos que causam a sua deterioração (Nielsen et al., 2008; Sofos & Geornaras, 2010). Os microrganismos responsáveis por causar alterações em produtos cárneos são principalmente as bactérias lácticas, tais como *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp, e outras como *Brochotrix thermosfacta*, *Pseudomonas* spp., bolores e leveduras (Mataragas et al., 2006).

As alterações nos produtos cárneos e os microrganismos 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 microrganismos predominantes são *Lactobacillus* spp e *Brochotrix thermosfacta*, responsáveis por aumentar a acidez do alimento (Doulgeraki et al., 2012; Nychas et al., 2008). O desenvolvimento de bolores poderá ocorrer em produtos cárneos com Aw mais baixa, como salame e presunto cru, ou em carnes com a superfície ressecada.

O processo de cozimento utilizado na elaboração de salsichas e mortadelas elimina a maioria dos microrganismos que estejam na forma vegetativa, porém pode ocorrer recontaminação nas etapas de depelagem, fatiamento e embalagem. Os microrganismos comumente envolvidos na deterioração destes alimentos são as bactérias lácticas, *Leuconostoc* spp, *Br. thermosphacta* e leveduras. As bactérias lácticas podem causar a formação de pigmentos verdes e descoloração na superfície do alimento, estufamento da embalagem e aumento da acidez (Grau, 2001). Outra alteração importante é o aparecimento de limo superficial, resultante da multiplicação de bactérias lácticas e leveduras, capazes de multiplicar na superfície de produtos cárneos que apresentam umidade adequada, mesmo quando mantidos em temperatura de refrigeração (Borch et al., 1996).

1.3 Compostos antimicrobianos para controle de *L. monocytogenes* em produtos cárneos

Os alimentos perecíveis são geralmente armazenados em baixas temperaturas com o objetivo de diminuir a velocidade de multiplicação de microrganismos e prolongar sua vida de prateleira, porém este procedimento não elimina microrganismos indesejáveis

(Richardson, 2001).. Assim, a tecnologia de obstáculos, baseada na utilização simultânea de diferentes técnicas para conservação de alimentos, vem sendo adotada com sucesso para melhorar a conservação e a segurança dos alimentos.

Durante a fabricação de produtos cárneos prontos para consumo, o tratamento pelo calor é o processo mais eficiente para controlar microrganismos patogênicos. No entanto, o controle efetivo desses microrganismos nesses alimentos depende das etapas posteriores a esse tratamento. Devido à dificuldade de controlar a contaminação do ambiente industrial por *L. monocytogenes*, obstáculos adicionais para a sua multiplicação podem ser aplicados (Leistner, 2000), como o uso de aditivos antimicrobianos, dentre os quais pode-se citar lactato de sódio, nisina, fumaça líquida e outros compostos (Zhu et al., 2005).

1.3.1 Lactato de sódio

O lactato de sódio é um aditivo alimentar empregado como umectante, antioxidante e regulador de acidez em embutidos cárneos. O *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) estabeleceu que a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de lactato de sódio é "não especificada", o que significa que não há limite máximo definido para seu consumo. Segundo a Instrução Normativa Federal nº 51 de 29 de Dezembro de 2006, o lactato de sódio pode ser utilizado em produtos cárneos em quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico desejado (Brasil, 2006).

A adição de lactato de sódio em peças de carnes ou em carne moída pode melhorar a cor, maciez e sabor destes produtos (Maca et al., 1997; Vote et al., 2000). Além disso, vários estudos comprovam que o lactato de sódio ou de potássio tem efeito antibacteriano. Estes compostos aumentam a fase *lag* e diminuem a velocidade de multiplicação dos microrganismos, contribuindo para o aumento da estabilidade do produto durante o armazenamento (Bloukas et al., 1997; Lin & Lin, 2002; Choi & Chin, 2003).

A ação antimicrobiana do lactato baseia-se na diminuição do pH intracelular dos microrganismos. Isso se deve à alta capacidade dos ácidos orgânicos em penetrar pela membrana citoplasmática, levando a diferença de pH entre o meio extracelular e intracelular. Para regular essa diferença de pH, os microrganismos despendem muita energia, diminuindo sua velocidade de multiplicação (Shelef, 1994). Outro mecanismo descrito baseia-se na mudança da via fermentativa normalmente utilizada, para uma via fermentativa que acidifica menos o citoplasma bacteriano, mas resulta em menor produção de energia. A respiração anaeróbia tem como principal produto final o ácido lático ou acetato. Na presença de lactato,

ocorre a indução da produção de acetoína, um produto que acidifica menos o citoplasma, mas produz menos energia (Stasiewicz et al., 2011). A diminuição da *Aw* do alimento também é uma possível causa do efeito antimicrobiano do lactato, estendendo a fase *lag* e diminuindo a velocidade de multiplicação de microrganismos (O'Grady & Kerry, 2010).

Choi e Chin (2003), na Coreia do Sul, observaram que houve diferença de 2 log UFC/g nas contagens de *L. monocytogenes* em salsichas formuladas com 3,3% de lactato de sódio em comparação às contagens nas salsichas sem lactato de sódio, após oito semanas de armazenamento a 4 °C. Sallama e Samejima (2004) avaliaram a ação antimicrobiana do lactato de sódio a 3% em carne moída embalada à vácuo, armazenada durante 21 dias à 2 °C, verificando que as contagens padrão em placa nas amostras controle (sem antimicrobiano) atingiram 7 log UFC/g no oitavo dia de armazenamento, determinando o término da vida de prateleira da carne moída. Nas amostras adicionadas de lactato de sódio, essas contagens foram obtidas somente no 15° dia de armazenamento a 2 °C. A partir destes resultados concluiu-se que o lactato de sódio pode ser utilizado para reduzir a velocidade de multiplicação de microrganismos presentes na carne mantida em refrigeração.

1.3.2 Nisina

A nisina é uma bacteriocina produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. Foi descoberta nos anos 20 e é a bacteriocina mais conhecida atualmente. Ela inibe a multiplicação de bactérias Gram-positivas, sendo a única bacteriocina utilizada no Brasil em alimentos, permitida apenas em queijos de muita alta umidade, alta umidade, média umidade e baixa umidade, em uma concentração máxima de 12,5 mg por Kg de queijo (Brasil, 1996). Alguns estudos avaliaram sua atividade também em outros alimentos, como produtos cárneos. Reunanen & Saris (2004) observaram que a nisina não é destruída durante o processo de cozimento de salsichas e permanece ativa durante o armazenamento a frio, podendo ser utilizada na conservação de produtos cárneos cozidos.

No Brasil, Castro (2002) observou que a aplicação de uma solução de nisina a 200 ppm, em solução de ácido fosfórico grau alimentício (0,1%), à superfície de salsichas, não foi eficiente na redução da população de microrganismos mesófilos, bactérias lácticas e microrganismos psicrotróficos 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 boa 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*. Estes resultados indicam que a ação da nisina contra *L. monocytogenes* em produtos cárneos varia de acordo com a temperatura de armazenamento e nível de contaminação inicial.

Além da nisina livre, existem outros antimicrobianos à base de nisina disponíveis no mercado, como a nisina encapsulada, que mantém e prolonga o efeito antibacteriano deste peptídeo no alimento. Há também produtos que combinam a nisina a outros compostos, com a finalidade de aumentar sua atividade antimicrobiana.

A nisina livre possui meia-vida reduzida, sendo inativada rapidamente. A encapsulação da nisina tem a finalidade de prevenir ou reduzir sua degradação no produto cárneo causada pela exposição ao calor, mudanças de pH ou ação de proteases. A inativação pode ser retardada se a nisina for encapsulada em nanopartículas, liberando gradualmente o antimicrobiano em quantidade suficiente para a ação antimicrobiana no alimento (Faria-Tischer & Tischer, 2012).

A nisina pode ser combinada à compostos que alteram a permeabilidade da membrana celular das bactérias e facilitam sua penetração. O extrato de alecrim, por exemplo, utilizado como antioxidante por aumentar a estabilidade dos produtos cárneos armazenados por longos períodos em baixas temperaturas (Carthy et al., 2001), é rico em compostos fenólicos que alteram a permeabilidade da membrana celular das bactérias (Ettayebi et al., 2000; Singh et al., 2003; Vurma et al., 2006; Dimitrijević et al., 2007). Assim, ao combinar nisina com extrato de alecrim pode-se obter efeito antimicrobiano sinérgico (Gao et al., 2014).

1.3.3 Fumaça líquida

A defumação é um dos processos mais antigos para conservação de carnes. Durante a defumação, os compostos voláteis derivados da queima da madeira penetram na carne, conferindo-lhe sabor, aroma e coloração característicos, aumentando também a vida de prateleira. No entanto, a queima da madeira resulta na produção de substâncias indesejáveis, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, que apresentam atividade cancerígena (Morey, 2012). Para contornar este inconveniente, é possível utilizar a fumaça líquida, um produto obtido pela passagem da fumaça proveniente da queima da madeira através de um condensador, onde o líquido é captado em água, sendo filtrado até atingir a concentração desejada (Holley & Patel, 2005). Com este procedimento há a remoção dos hidrocarbonetos. Além disso, sua utilização garante uma melhor uniformidade do sabor na massa.

A fumaça líquida tem sido aplicada em diferentes tipos de alimentos como produtos cárneos, queijos e outros alimentos que não poderiam ser defumados pelo processo tradicional de queima da madeira, como temperos ou sopas (Guillén & Manzanos, 1996). Sua atividade antimicrobiana é atribuída à presença de compostos fenólicos e ácidos orgânicos que alteram a permeabilidade da membrana de microrganismos, principalmente bactérias Gram-positivas (Holley & Patel, 2005; Guilbaud et al., 2008; Martin et al., 2010).

Asita & Campbell (2008) estudaram a ação antimicrobiana de fumaças obtidas a partir de diversos tipos de madeira e observaram variação quanto ao seu espectro de ação. As fumaças obtidas a partir de Mogno e Abura inibiram a multiplicação de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto a fumaça obtida a partir de Alstonia inibiu *Staphylococcus aureus* e *Saccharomyces cerevisiae* e não teve efeito contra *Escherichia coli*, já a fumaça obtida a partir de Afara Preta inibiu a multiplicação de *Saccharomyces cerevisiae* somente. Assim, foi concluído que a fumaça proveniente de diferentes fontes de madeira possui uma composição própria, agindo contra os microrganismos de maneira diferente.

Gedela et al. (2007) estudaram a atividade da fumaça líquida contra *L. monocytogenes* (10^1 UFC/g) em salsichas imersas por 5, 15, 30, 60 e 90 segundos em fumaça líquida, durante armazenamento a 1,7°C por 10 semanas e verificaram que a população de *L. monocytogenes* se manteve abaixo do limite de detecção até o final do experimento em todas as salsichas estudadas. Nas salsichas não tratadas com a fumaça líquida a população de *L. monocytogenes* na quinta semana de armazenamento atingiu 10^8 UFC/mL, mostrando que a fumaça líquida foi eficiente no controle de *L. monocytogenes*. Estes autores mostraram também que o tempo de imersão das salsichas em fumaça líquida não influenciou nas contagens de *L. monocytogenes* durante o período de armazenamento.

Em trabalho piloto realizado no laboratório de microbiologia de alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas na Universidade de São Paulo, a atividade antibacteriana de três produtos comerciais à base de fumaça líquida (LSTA, AM5 e AM3) foi avaliada *in vitro*, verificando-se que os três produtos tiveram atividade inibitória contra várias cepas de microrganismos de interesse em produtos cárneos, como *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus* spp, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*.

Este projeto teve como objetivo explorar melhor o potencial de uso de diferentes antimicrobianos pela indústria de produtos cárneos, com foco no controle de *Listeria monocytogenes* em mortadela e salsicha, durante o armazenamento sob refrigeração

(8° C). O antimicrobiano com melhor ação inibitória contra *L. monocytogenes* também foi avaliado no controle de bactérias lácticas, bolores e leveduras em produto cárneo, durante o armazenamento sob refrigeração (8° C).

2. OBJETIVOS

Este estudo objetivou avaliar a ação antimicrobiana do lactato de sódio e de duas formulações comerciais à base de nisina (produtos A e B) em mortadela, e do lactato de sódio e fumaça líquida em salsicha, experimentalmente contaminadas com um *pool* de seis cepas de *L. monocytogenes*, embaladas a vácuo e armazenadas à 8 °C. Os aditivos com melhor atividade anti-listeria também foram avaliados quanto ao controle de bactérias lácticas, bolores e leveduras em salsichas, durante o armazenamento à 8 °C.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A atividade antimicrobiana do lactato de sódio e dos produtos A e B, ambos à base de nisina, foi avaliada contra *L. monocytogenes* em mortadela. A atividade antimicrobiana do lactato de sódio e da fumaça líquida, separados e em combinação, foi avaliada contra *L. monocytogenes*, bactérias lácticas, bolores e leveduras em salsichas *hot-dog*.

3.1 Antimicrobianos utilizados no estudo.

3.1.1 Produto A

O nome comercial do produto A é NovaGARD LM100[®], comercializado pela Dupont Ltda. Este produto é uma mistura de nisina encapsulada, nisina livre e extrato de alecrim, de aplicação em produtos cárneos prontos para consumo, cozidos ou curados, com a finalidade de inibir a multiplicação de *Listeria* spp e microrganismos deteriorantes (Erdmann, 2011).

3.1.2 Produto B

O nome comercial do produto B é NovaGARD NR100[®], comercializado pela Dupont Ltda. Este produto é uma mistura de nisina livre e extrato de alecrim. Tal como o produto A, o extrato de alecrim é combinado à nisina com o objetivo de obter um efeito antimicrobiano sinérgico (Erdmann, 2011).

3.1.3 Lactato de sódio

O nome comercial do lactato de sódio é PURASAL[®]S, comercializado pela Purac Sínteses Indústria e Comércio Ltda. Este produto é obtido através da fermentação de açúcares, apresenta-se na forma líquida, possui sabor levemente salgado e pH neutro.

3.1.4 Fumaça líquida

Foi utilizada fumaça líquida AM5, fornecida pela empresa Kraki Kienast & Kratschmer Ltda. O trabalho foi desenvolvido com um único lote de produto, que apresentou a seguinte especificação: acidez 0,12%, gravidade específica 1,057, nível de fenóis 0,03mg/mL e pH 6.

3.2 Fabricação de mortadela

As mortadelas utilizadas neste trabalho foram fornecidas pela Danisco Brasil Ltda. As mortadelas haviam sido fabricadas em um frigorífico parceiro desta empresa, em dois lotes diferentes.

O primeiro lote foi composto por mortadelas apresentando quatro formulações diferentes:

- Formulação 1 - contendo 0,25% do produto A,
- Formulação 2 - contendo 0,05% do produto B,
- Formulação 3 - contendo 2% de lactato de sódio LS
- Formulação 4 – controle (sem adição de antimicrobiano)

O segundo lote foi composto por mortadelas apresentando seis formulações diferentes:

- Formulação 1 - contendo extrato de alecrim (1a),
- Formulação 2 - contendo nisina livre (2a),
- Formulação 3 - contendo nisina encapsulada (3a),
- Formulação 4 - contendo nisina livre + nisina encapsulada (4a)
- Formulação 5 - nisina livre na concentração de 4A (5a)
- Formulação 6 – controle (sem adição de antimicrobiano)

A concentração de cada antimicrobiano nas formulações 1a, 2a, 3a e 4a foi a mesma presente no produto A.

Segundo informado pela empresa fornecedora das mortadelas, a composição era: gordura suína (10%), carne mecanicamente separada de frango (60%), emulsão de pele suína (7%), carne suína (4,1%), gelo ou água (5%), fécula de mandioca (5%), sal (3%), tripolifosfato de sódio (0,3%), proteína vegetal (2,5%), nitrito de sódio (0,016 %), eritorbato de sódio (0,05%) e cochonilha (corante cor carmim) (0,02%). As carnes, fosfatos, sal, água e a proteína vegetal haviam sido misturados em um *cutter* operando em baixa velocidade. Após formar uma massa homogênea, aumentou-se a velocidade do *cutter* e adicionou-se gordura e os demais ingredientes. O tempo total no *cutter* foi de aproximadamente 10 minutos e a temperatura da massa não ultrapassou 12 °C. A emulsão formada foi embutida em tripa de poliamida, calibre 60/90 mm, previamente hidratada em água fria. O cozimento foi feito em água por 10 minutos, para que a massa atingisse a temperatura de 82 °C. Após o cozimento, as mortadelas foram resfriadas com água fria até atingir a temperatura ambiente e armazenadas em câmara fria.

Após a chegada ao laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, as mortadelas foram fatiadas em fatias de 2 mm de espessura empregando-se um cortador de frios semiautomático (Urano-SMS-048) (**Figura 1**). Em seguida, seis fatias, correspondentes a 25 g de produto, foram colocadas em sacos de nylon poli, próprios para embalagem a vácuo (espessura: 62 µm; taxa de permeabilidade ao oxigênio: 1,375 mL (CNTP) m³ m⁻² dia⁻¹; taxa de permeabilidade ao vapor d'água: 3,5g água m⁻² dia⁻¹). Até o momento do uso, as embalagens contendo as fatias de mortadela foram mantidos em recipiente contendo gelo reciclável (**Figura 2**), não ultrapassando 2 horas.

Figura 1 - Processo de fatiamento da mortadela.

Figura 2 - Embalagens contendo as fatias de mortadela nos recipientes contendo gelo reciclável. Etapa pré-contaminação.

3.3 Fabricação de salsichas *hot-dog*.

As salsichas *hot-dog* utilizadas neste trabalho foram fabricadas na planta piloto da empresa Kraki Kienast & Kratschmer Ltda. seguindo as normas de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) do produto. Foram fabricados dois lotes de salsichas em períodos distintos, com a mesma formulação.

As salsichas foram formuladas com carne mecanicamente separada de frango (60%), dianteiro bovino (20%), fécula de mandioca (2%), nitrato de sódio (0,003%), nitrito de sódio (0,015%), açúcar (0,075%), eritorbato de sódio (0,075%), tripolifosfato de sódio (0,25%), condimentos (0,5%), proteína vegetal (3%), gelo (10%) e sal (2,09%). Para o preparo das salsichas com lactato adicionou-se à mistura de ingredientes 100g de lactato de sódio (PURAC, Purasal®S), para atingir a concentração de 2%. Para o preparo das salsichas não tratadas (controle), adicionou-se 100 g de gelo à mistura. Para cada formulação, preparou-se 5 Kg de massa.

Os ingredientes foram colocados no *cutter*, triturados e homogeneizados por 10 minutos (**Figura 3**), para formar a emulsão cárnea. A temperatura da emulsão estava entre 6 a 8 °C.

Figura 3 - Homogeneização dos ingredientes para fabricação das salsichas *hot-dog*.

As massas foram embutidas em tripas de celulose calibre 20/22 (Viscofan do Brasil Ltda.) empregando-se uma embutideira (**Figura 4**), cozidas em estufa a seco a 80°C

por 20 minutos e em seguida, em estufa com 100% de umidade a 90°C por 20 minutos (**Figura 5**). A temperatura no interior das salsichas atingiu 74°C.

Figura 4 - Embutimento da emulsão cárnea em tripa de celulose.

Figura 5 - Estufa para cozimento das salsichas.

Após o cozimento, as salsichas foram resfriadas, depeladas, tingidas por imersão em solução de corante de urucum 5% por quatro minutos e imersas em solução de ácido fosfórico 0,2% por 3 minutos para fixar a cor (**Figura 6**).

Figura 6 - Imersão na solução de corante de urucum (5%) (A) e na solução de ácido fosfórico (0,2%) (B).

As salsichas foram mantidas em uma câmara fria a 8 °C por 15 minutos para secagem (**Figura 7**). Em seguida, os dois lotes de salsicha foram embalados a vácuo, separadamente (uma embalagem contendo as salsichas com lactato e uma embalagem contendo as salsichas controle), e transportadas até o laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP em recipiente isotérmico contendo gelo reciclável.

Figura 7 - Salsichas na câmara fria (8°C) para secagem.

Metade das salsichas formuladas sem lactato de sódio e metade das salsichas formuladas com lactato de sódio foram imersas por 20 segundos em uma solução de fumaça líquida AM5 pura. Dessa forma, foram obtidos quatro tipos de salsicha:

1. Sem lactato de sódio, não tratada com fumaça líquida (Controle);
2. Sem lactato de sódio, tratada com fumaça líquida (FL);
3. Com lactato de sódio, não tratada com fumaça líquida (Lac);
4. Com lactato de sódio e tratada com fumaça líquida (FL+Lac).

Uma unidade (aproximadamente 50 g) de cada tipo de salsicha foi colocada em um saco de nylon poli, próprio para embalagem à vácuo (espessura: 62 μm ; taxa de permeabilidade ao oxigênio: 1,375 mL (CNTP) $\text{m}^3 \text{m}^{-2} \text{dia}^{-1}$; taxa de permeabilidade ao vapor d'água: 3,5g água $\text{m}^{-2} \text{dia}^{-1}$). Os sacos com as salsichas foram mantidos em refrigeração até o momento da contaminação experimental, que não ultrapassou duas horas.

3.4 Contaminação experimental das fatias de mortadelas e salsichas

3.4.1 Preparo do inóculo de *L. monocytogenes*

O trabalho foi realizado com um *pool* de seis cepas de *L. monocytogenes*, sendo uma cepa de referência (ATCC 7644) e cinco cepas isoladas de produtos cárneos (046/07, LM 508, LM 512, LM 595, LM 584), pertencentes à coleção de culturas do laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Para o preparo da cultura empregada na contaminação experimental, cada cepa foi cultivada separadamente em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), a 37 °C por 18-24 horas e, em seguida, em novo caldo BHI a 37 °C por 10 horas, correspondente ao início da fase estacionária, como determinado por uma curva padrão de crescimento. Volumes iguais de cada cultura foram transferidos para um tubo Falcon e a mistura foi centrifugada a 6000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em água peptonada esterilizada 0,1%, repetindo-se este procedimento por três vezes. Após a última centrifugação, o sedimento foi ressuspensão em água peptonada esterilizada 0,1% para obter uma suspensão com densidade ótica (DO) de 0,5 a 595 nm, determinada em espectrofotômetro (Ultrospec[®] 2000). Esta suspensão continha 10⁸ UFC/mL, como determinado previamente através de uma curva padrão de crescimento.

3.4.2 Contaminação experimental das fatias de mortadela

O método de contaminação das fatias de mortadela foi baseado no guia para *Challenge test*, conforme Anonymous (2003) e Anonymous (2008). A suspensão contendo as seis culturas de *L. monocytogenes* (10⁸ UFC/mL) foi diluída em água peptonada 0,1% (p/v) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para obtenção de uma suspensão com aproximadamente 5x10⁵ UFC/mL. Em seguida, 0,1 mL desta suspensão foi adicionada a cada um dos sacos contendo 25g de produto (seis fatias), obtendo-se uma contaminação inicial de aproximadamente 2x10³ UFC/g de produto.

Os sacos com as fatias de mortadela experimentalmente contaminadas foram selados e embalados a vácuo, empregando-se uma seladora (Tec Maq, AP-500) (**Figura 8**). Um experimento piloto, no qual foram feitas contagens microbiológicas em

diferentes pontos das fatias, indicou que o inóculo adicionado distribuía-se de maneira uniforme por todas as fatias de mortadela. Os sacos contendo as fatias de mortadela experimentalmente contaminadas foram armazenadas a 8° C (**Figura 9**). Todos os experimentos foram repetidos três vezes, utilizando-se amostras (seis fatias por amostra) independentes.

Figura 8 - Embalagem a vácuo das fatias de mortadela experimentalmente contaminadas com *L. monocytogenes*.

Figura 9 - Refrigeração das fatias de mortadela experimentalmente contaminadas com *L. monocytogenes*.

3.4.3 Contaminação experimental das salsichas

Para a contaminação das salsichas, a suspensão contendo as seis culturas de *L. monocytogenes* (10^8 UFC/mL) foi submetida a diluições decimais em água peptonada esterilizada 0,1% (p/v) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para obtenção de uma suspensão com aproximadamente 4×10^6 UFC/mL. Em seguida, transferiu-se 0,1mL desta suspensão a cada um dos sacos contendo uma unidade de salsicha (**Figura 10**), obtendo-se uma contaminação inicial de aproximadamente 8×10^3 UFC/g.

Os sacos contendo as salsichas experimentalmente contaminadas foram selados a vácuo, utilizando-se uma seladora (Tec Maq, AP-500). Um experimento piloto, no qual foram feitas contagens microbiológicas em diferentes pontos das salsichas, indicou que o inóculo adicionado distribuía-se de maneira uniforme pela superfície da salsicha. As embalagens contendo as salsichas foram armazenadas a 8° C. Todos os experimentos foram repetidos duas vezes, com duas amostras independentes

Figura 10 - Salsichas experimentalmente contaminadas com *L. monocytogenes* embaladas a vácuo.

3.5 Contagem de *Listeria monocytogenes* nas fatias de mortadela e nas salsichas

As contagens de *L. monocytogenes* nas fatias de mortadela foram feitas nos tempos 0, 4h, 24h após a contaminação experimental e, em seguida, a cada 10 dias, até 30 dias de armazenamento a 8 °C. As contagens de *L. monocytogenes* nas salsichas foram feitas nos tempos 0, 1, 2, 8, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 8° C.

Para cada determinação, alíquotas de 25 g das amostras de mortadelas foram transferidas para sacos de *stomacher* esterilizados, ao qual adicionou-se 225 mL de água peptonada esterilizada 0,1% (p/v) (Oxoid, Bansigstoke, Inglaterra). O mesmo foi realizado com as amostras de salsichas. As misturas foram homogeneizadas por 60 segundos em um *Stomacher* 400 (Seward Medical, Inglaterra), e submetidas a diluições decimais seriadas em água peptonada esterilizada 0,1% (p/v). Duas porções de 0,1mL de cada diluição foram transferidas para a superfície de duas placas de ágar Oxford, (Oxoid, Bansigstoke, Inglaterra), espalhando-se os inóculos com alças de Drigalsky descartáveis. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas, efetuando-se a contagem das colônias que apresentavam morfologia característica de *L. monocytogenes* (colônias pequenas, com aspecto perolado e circundadas por um halo escuro). Os resultados foram expressos em UFC/g de produto.

Antes da contaminação experimental, todas as amostras de mortadela e salsicha foram submetidas à pesquisa de *L. monocytogenes*, utilizando-se o método ISO 11290-1 (ISO, 1996).

3.6 Contagem de bactérias lácticas, bolores e leveduras na salsichas *hot-dog*

As contagens de bactérias lácticas e bolores e leveduras foram feitas nas salsichas não contaminadas nos tempos 0, 1, 2, 8, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 8 °C. Para cada determinação, 25 g de cada salsicha de cada embalagem foram transferidos para um saco de *stomacher* esterilizado, ao qual se adicionou 225 mL de água peptonada esterilizada 0,1% (p/v) (Oxoid, Bansigstoke, Inglaterra). A mistura foi homogeneizada por 60 segundos em um *Stomacher* 400 (Seward Medical, Inglaterra). Esta mistura foi submetida a diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% (p/v). Para a contagem de bactérias lácticas, transferiu-se 1 mL de cada diluição para duas placas de petri adicionando-se ágar MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) (Oxoid,

Bansigstoke, Inglaterra) contendo 0,1% (p/v) de sorbato de sódio, como inibidor de leveduras, como recomendado na ISO 15214 (ISO, 1998). Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose à 30°C por 48 horas. Para contagem de bolores e leveduras, foram empregadas as placas Petrifilm™ YM (3M do Brasil Ltda.). Para esta determinação, transferiu-se 1 mL de cada diluição para duas placas Petrifilm™ YM, após a geleificação do meio as placas foram incubadas à 25 °C por 4 dias.

3.7 Determinação do pH e Aw da mortadela e salsichas

O pH das mortadelas e das salsichas foi determinado empregando-se um potenciômetro próprio para produtos cárneos (Hanna, HI 9163). A Aw foi medida utilizando Novasina aw-Center AWC 503-C (Novasina, Pfäikon, Switzerland). As medidas de pH e Aw das amostras foram feitas nos tempos 0, 10, 20 e 30 dias de armazenamento a 8 °C.

3.8 Análise estatística

As contagens de *L. monocytogenes*, bactérias lácticas e bolores e leveduras foram transformadas em logaritmos (log UFC/g) e submetidas à análise de variância ANOVA e ao teste de Tukey para verificar a significância das diferenças entre elas, considerando grau de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade do lactato de sódio e dos produtos A e B contra *Listeria monocytogenes* em mortadela fatiada, durante armazenamento a 8 °C.

Os resultados das contagens de *L. monocytogenes* nas amostras de mortadela contendo lactato de sódio, produto A e produto B durante o armazenamento a 8 °C estão apresentados nas **Figuras 11 e 12**, correspondentes às contagens até 24 horas e até 30 dias, respectivamente.

Figura 11 – Contagens de *L. monocytogenes* (log UFC/g) em mortadela fatiada embalada a vácuo contendo lactato de sódio (vermelho), produto A (verde), produto B (roxo) e controle (azul) durante armazenamento a 8 °C por 24 horas.

As contagens de *L. monocytogenes* nas fatias de mortadela nas primeiras quatro horas de armazenamento a 8 °C permaneceram estáveis. Na 24ª hora de armazenamento, observou-se um aumento de 0,8 log UFC/g nas contagens de *L. monocytogenes* nas fatias de mortadela controle e de 0,3 log UFC/g nas fatias contendo lactato de sódio e produto B. As contagens permaneceram estáveis nas mortadelas formuladas com o produto A por 24 horas de armazenamento.

Figura 12 – Contagens de *L. monocytogenes* (log UFC/g) em mortadela fatiada embalada a vácuo com adição de lactato de sódio (vermelho), produto A (verde), produto B (roxo) e controle (azul) durante armazenamento a 8°C por 30 dias.

No 10º dia de armazenamento a 8 °C, as contagens de *L. monocytogenes* nas fatias de mortadelas formuladas com o produto A foram 3 log UFC/g inferiores às observadas nas fatias de mortadelas formuladas com o produto B, lactato de sódio e controle (sem adição de antimicrobiano) ($p < 0,001$). Este resultado sugere que a nisina encapsulada presente no produto A foi liberada após alguns dias de armazenamento e que sua capacidade de agir contra *L. monocytogenes* foi mantida. Malheiros et al. (2012), avaliaram a ação de nisina livre e de nisina encapsulada em lipossomas contra *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal artificialmente contaminado, armazenado à 7 °C. As contagens de *L. monocytogenes* nos queijos tratados com nisina livre e nisina encapsulada ficaram abaixo do limite de detecção até o quinto dia de armazenamento. No oitavo dia, as contagens de *L. monocytogenes* nos queijos não tratados estavam entre 8 e 8,5 log UFC/g, enquanto as contagens nos queijos tratados estavam entre 3 e 4 log UFC/g, não havendo diferença entre os tipos de tratamento. No entanto, no 14º dia de armazenamento, as contagens de *L. monocytogenes* nos queijos tratados com nisina encapsulada foram 2 log UFC/g inferiores às contagens de *L. monocytogenes* nos queijos tratados com nisina livre, sugerindo também que a ação inibitória da nisina encapsulada foi prolongada, mantendo a capacidade de agir contra o microrganismo alvo após dias de armazenamento.

No presente estudo, apesar da população de *L. monocytogenes*, no final do experimento, ter atingido contagens entre 7 e 8 log UFC/g nas mortadelas formuladas com o produto A, a velocidade de multiplicação do patógeno nestas amostras (0,15 log UFC/g/dia) foi menor que a verificada nas demais formulações de mortadela (0,45 log UFC/g/dia).

Com a finalidade de verificar quais compostos presentes no produto A foram responsáveis pela diminuição da velocidade de multiplicação de *L. monocytogenes* nas fatias de mortadela formuladas com este produto, solicitou-se a fabricação de mortadelas formuladas com extrato de alecrim (1a), nisina livre (2a), nisina encapsulada (3a), nisina livre + nisina encapsulada (4a), nisina livre na mesma concentração de 4a (5a) e mortadela controle (sem adição de antimicrobiano). Os antimicrobianos utilizados nas cinco formulações (1a, 2a, 3a, 4a e 5a) foram adicionados nas mesmas concentrações presente no produto A. Os resultados das contagens de *L. monocytogenes* nas amostras de mortadelas com estas formulações, durante armazenamento a 8 °C, estão apresentados nas **Figuras 13 e 14**, correspondentes às contagens até 24 horas e até 30 dias, respectivamente.

Figura 13 – Contagens de *L. monocytogenes* (log UFC/g) em mortadela fatiada embalada a vácuo com adição de extrato de alecrim (1a) (vermelho), nisina livre (2a) (verde), nisina encapsulada (3a) (roxo), nisina livre + nisina encapsulada (4a) (azul), nisina livre na mesma concentração de 4B (5a) (laranja) e sem adição de antimicrobiano (6a) (preto) durante armazenamento a 8 °C por 24 horas.

Figura 14 – Contagens de *L. monocytogenes* (log UFC/g) em mortadela fatiada embalada a vácuo com adição de extrato de alecrim (1a) (vermelho), nisina livre (2a) (verde), nisina encapsulada (3a) (roxo), nisina livre + nisina encapsulada (4a) (azul), nisina livre na mesma concentração de 4B (5a) (laranja) e sem adição de antimicrobiano (6a) (preto) durante armazenamento a 8 °C por 30 dias.

As contagens de *L. monocytogenes* nas fatias de mortadela formulada com nisina livre (5a) no tempo zero foram 0,5 log UFC/g inferiores às contagens de *L. monocytogenes* nas fatias de mortadela controle ($p=0,0065$), como apresentado na **Figura 13**, sugerindo que a nisina livre agiu contra o patógeno em poucos minutos de contato. Não houve aumento significativo nas contagens de *L. monocytogenes* por 24 horas de armazenamento, em todas as formulações de mortadela.

Entre o tempo zero e o quinto dia de armazenamento, as contagens de *L. monocytogenes* nas fatias de mortadela controle aumentaram de 3,5 log UFC/g para 7 log UFC/g, enquanto as contagens de *L. monocytogenes* nas fatias de mortadela formuladas com nisina livre (5a) aumentaram de 3 log UFC/g para 4 log UFC/g, indicando que a velocidade de multiplicação foi 0,7 log UFC/g/dia e 0,2 log UFC/g/dia, respectivamente. Esse resultado mostra que além da redução inicial nas contagens de *L. monocytogenes*, a nisina livre (5a) também diminuiu a velocidade de multiplicação deste patógeno. É possível concluir ainda que a concentração total de nisina (livre + encapsulada) no produto A é maior do que a concentração total de nisina no produto B (livre), já que este não apresentou ação inibitória contra *L. monocytogenes*.

No décimo dia de armazenamento, a diferença entre as contagens de *L. monocytogenes* nas fatias de mortadela controle e nas fatias de mortadela formulada com nisina livre (5a) foi de apenas 1 log UFC/g, mostrando que o patógeno foi capaz de se multiplicar em maior velocidade após o quinto dia de armazenamento (0,7 log UFC/g/dia), alcançando contagens de 8 log UFC/g no 20° dia de armazenamento. Samelis et al. (2005) verificaram redução inicial de 1,0-1,5 log UFC/cm² na população de *L. monocytogenes* devido à adição de nisina em mortadela suína fatiada. O efeito bacteriostático foi mantido por 10 dias de armazenamento a 4 °C. Porém, as contagens de *L. monocytogenes* aumentaram entre 2 e 5 log UFC/cm² no 20° dia e atingiram contagens semelhantes às contagens na mortadela controle no 50° dia de armazenamento. Assim como neste estudo, a nisina foi capaz de reduzir a população inicial de *L. monocytogenes* e diminuir sua velocidade de multiplicação, porém o patógeno conseguiu se multiplicar e alcançar contagens semelhantes à encontrada na formulação controle.

Por outro lado, o efeito bacteriostático da nisina pode ser mantido ao longo do tempo de prateleira. Camargo (2011) isolou bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas a partir de mortadela fatiada, purificou parcialmente a bacteriocina considerada mais estável e fez sua aplicação em mortadelas fatiadas, experimentalmente contaminadas com um pool de cepas de *L. monocytogenes*. As contagens foram feitas ao longo de 40 dias de armazenamento a 7 °C, observando-se redução imediata de 1 log UFC/g nas contagens nas mortadelas tratadas, sendo que as contagens permaneceram estáveis durante todo o período de armazenamento, diferente dos resultados obtidos neste estudo. No entanto, as contagens também permaneceram estáveis nas fatias de mortadela não tratadas. No presente estudo, as contagens de bactérias lácticas em amostras escolhidas aleatoriamente foram baixas, excluindo a possibilidade da *L. monocytogenes* ter sido inibida por competição com estes microrganismos.

Mangalassary et al. (2007) também observaram inibição de *L. monocytogenes* em mortadela fatiada, embalada à vácuo, tratada com nisina (2mg/mL = 5.000 UA/mL) e pasteurizada após a embalagem (65 °C por 32 segundos), durante armazenamento a 4 °C por 12 semanas. A pasteurização pós embalagem foi capaz de causar uma redução de 3,5 log UFC/g na população de *L. monocytogenes*, a qual manteve-se entre 2 e 3 log UFC/g ao longo do período de armazenamento. Nas fatias de mortadela tratadas com nisina e pasteurizadas após a embalagem, a população de *L. monocytogenes* reduziu 3,8 log UFC/g após o tratamento térmico e após três semanas de

armazenamento não foi mais possível detectar *L. monocytogenes* nas mortadelas. Embora a pasteurização pós embalagem tenha reduzido as contagens de *L. monocytogenes*, a bactéria foi capaz de se manter viável ao longo do tempo de prateleira. A combinação da pasteurização e adição de nisina alcançou efeito antimicrobiano mais efetivo, por manter durante o armazenamento atividade inibitória à multiplicação do patógeno. Estes resultados mostram que aplicar múltiplos obstáculos é a melhor maneira de controlar a multiplicação de microrganismos em alimentos.

Os antimicrobianos adicionados nas demais formulações de mortadela (1a, 2a, 3a e 4a) não foram capazes de inibir significativamente a multiplicação de *L. monocytogenes*, uma vez que as diferenças encontradas entre as contagens não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$).

No presente trabalho os resultados mais significativos quanto à inibição de *L. monocytogenes* em mortadela fatiada foram obtidos nas mortadelas formuladas com o produto A. Este produto é uma combinação de diversos antimicrobianos e mostrou ter efeito inibitório mais eficiente que cada antimicrobiano isoladamente, devido à sinergia entre seus componentes. O efeito sinérgico entre antimicrobianos é um fator favorável para a bioconservação de alimentos, uma vez que possibilita a utilização de quantidades menores de cada componente ativo para a obtenção de efeito inibitório satisfatório, provocando menor alteração nas características sensoriais do alimento (Abdollahzadeh et al., 2014).

4.2 Atividade de fumaça líquida e lactato de sódio contra *Listeria monocytogenes*, bactérias lácticas, bolores e levedura, em salsichas *hot-dog*, durante armazenamento a 8°C

Os resultados das contagens de *L. monocytogenes* nas amostras de salsichas formuladas com e sem lactato de sódio, imersas e não imersas em fumaça líquida, durante armazenamento a 8 °C por 48 horas e até 28 dias estão apresentados nas **Figuras 15 e 16**, respectivamente.

Figura 15 – Contagens de *L. monocytogenes* (logUFC/g) em salsichas embaladas a vácuo formuladas com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida + lactato de sódio (roxo) e controle (azul), durante armazenamento a 8 °C por 28 dias.

Figura 16 – Contagem de *L. monocytogenes* (log UFC/g) em salsichas embaladas a vácuo formuladas com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida + lactato de sódio (roxo) e controle (azul), durante armazenamento a 8 °C por 28 dias.

Conforme observado na **Figura 15**, o tratamento das salsichas com fumaça líquida + lactado de sódio causou uma redução de aproximadamente 1 log UFC/g na população de *L. monocytogenes* ($p=0,01$) no tempo zero, em relação às

contagens nas salsichas controle. Após esta redução, verificou-se que os valores das contagens de *L. monocytogenes* permaneceram próximos em todas as formulações de salsichas até 24 horas de armazenamento, havendo redução nas contagens somente nas salsichas tratadas com fumaça líquida, após 48 horas. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Martin et al. (2010) e Gedela et al. (2007) que também verificaram redução inicial de 1 log UFC/g na população de *L. monocytogenes*, em salsichas artificialmente contaminadas, após tratamento com fumaça líquida.

No oitavo dia, as contagens de *L. monocytogenes* nas salsichas imersas em fumaça líquida (formuladas com e sem lactato de sódio) eram aproximadamente 3 log UFC/g inferiores às contagens de *L. monocytogenes* nas salsichas não imersas em fumaça líquida, independentemente da presença de lactato de sódio. No 28º dia de armazenamento, as contagens de *L. monocytogenes* nas salsichas formuladas com lactato de sódio e imersas em fumaça líquida foram 2 log UFC/g inferiores às contagens obtidas nas salsichas submetidas aos demais tratamentos. Estes resultados sugerem que a utilização isolada da fumaça líquida controlou a multiplicação de *L. monocytogenes* até o oitavo dia de armazenamento e que a adição de lactato de sódio prolongou o efeito antimicrobiano, mostrando que esta combinação foi mais efetiva no controle da multiplicação de *L. monocytogenes* nas salsichas embaladas a vácuo.

No trabalho de Martin et al. (2010), a fumaça líquida aplicada através de *spray* em salsichas artificialmente contaminadas com *L. monocytogenes* foi capaz de impedir a multiplicação do patógeno por 130 dias de armazenamento à 4 °C. Suñen et al. (2003) estudaram a atividade antimicrobiana de diferentes compostos de fumaça líquida, concluindo que seu efeito depende de sua composição e da natureza do microrganismo alvo. As fumaças líquidas com maior concentração de compostos fenólicos agiram melhor no controle de *L. monocytogenes*, enquanto as fumaças líquidas com baixa concentração destes compostos apresentaram atividade antimicrobiana contra outros microrganismos. Estes resultados sugerem que outros compostos da fumaça líquida também apresentam atividade antimicrobiana e que como seus componentes e concentrações variam muito entre diferentes fumaças, a atividade antimicrobiana de cada extrato de fumaça deve ser investigada antes de ser aplicada no controle de um microrganismo. A fumaça líquida AM5 utilizada no presente trabalho possuía níveis de compostos fenólicos dez vezes inferiores aos da fumaça líquida utilizada no trabalho de Martin et al. (2010), o que pode explicar a ação inibitória menos efetiva.

Os resultados das contagens de bolores e levedura nas amostras de salsicha formuladas com e sem lactato de sódio, imersas e não imersas em fumaça líquida, durante armazenamento a 8 °C até 48 horas e até 28 dias estão apresentados nas **Figuras 17 e 18**, respectivamente.

Figura 17 – Contagens de bolores e leveduras (log UFC/g) em salsichas embaladas a vácuo formuladas com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida + lactato de sódio (roxo) e controle (azul), durante armazenamento a 8 °C por 48 horas.

Figura 18 – Contagens de bolores e leveduras (log UFC/g) em salsichas embaladas a vácuo formuladas com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida + lactato de sódio (roxo) e controle (azul), durante armazenamento a 8 °C por 28 dias.

As contagens de bolores e leveduras nas salsichas controle permaneceram estáveis por 48 horas de armazenamento, passando de uma população inicial de 3 log UFC/g para 3,5 log UFC/g em oito dias e para 5 log UFC/g em 21 dias de armazenamento a 8 °C. As contagens de bolores e leveduras nas salsichas formuladas com lactato de sódio, fumaça líquida e lactato de sódio + fumaça líquida apresentaram valores semelhantes às contagens nas salsichas controle, por 48 horas de armazenamento ($p>0,05$). No oitavo dia, as contagens nas salsichas formuladas com antimicrobianos apresentaram diferença de 1 log em relação às contagens nas salsichas controle ($p=0,006$).

As contagens de bolores e leveduras nas salsichas imersas em fumaça líquida permaneceram próximo de 3 log UFC/g por 21 dias de armazenamento. Milly et al. (2005) determinaram a concentração mínima inibitória (MIC) de nove fumaças líquidas contra diversos microrganismos e comprovaram que a fumaça líquida, quando adicionada abaixo do MIC, prolonga a fase *lag* de multiplicação de leveduras.

Um resultado inesperado foi observado nas contagens do 28º dia de armazenamento. As contagens de bolores e leveduras nas salsichas formuladas com lactato de sódio + fumaça líquida aumentaram para 5,5 log UFC/g, ficando próximo das contagens obtidas nas salsichas com lactato de sódio e controle, enquanto que as contagens de bolores e leveduras nas salsichas imersas em fumaça líquida permaneceram próximas ao valor inicial. Houtsma et al. (1993), ao determinarem o MIC do lactato de sódio contra diferentes patógenos e microrganismos deteriorantes, concluíram que as leveduras são os microrganismos que possuem maior resistência e que provavelmente fazem parte da microbiota deteriorante de produtos cárneos. Bingol & Bostan (2006) avaliaram o efeito da adição de lactato de sódio em diferentes concentrações no aumento da vida de prateleira de salsichas armazenadas por 60 dias a 4 °C e observaram que a adição de lactato de sódio não teve efeito inibitório sobre a multiplicação de leveduras. Apesar da resistência de leveduras ao lactato de sódio, não era esperado que sua população aumentasse nesta formulação devido ao tratamento combinado com fumaça líquida.

Devido à existência de uma etapa de cozimento das salsichas, suficiente para eliminar bolores e leveduras, sua presença pode ser atribuída a recontaminação após tratamento térmico, que pode ter ocorrido durante a depelagem, secagem ou embalagem do alimento. Nielsen et al. (2008) estudaram o potencial de leveduras

causarem deterioração de quatro tipos de produtos cárneos (bacon, salame, presunto e patê de fígado) durante seu processamento, no produto final e ao final da vida de prateleira. Foi possível isolar leveduras a partir de todas as matérias primas (carne cruas) e superfícies de equipamentos, o que poderia levar a contaminação do produto final. Apesar disso, poucos produtos finais apresentaram contagens de leveduras (1,0-1,8 UFC/cm²). Porém, ao estudar a viabilidade de 14 leveduras isoladas a partir dos produtos cárneos estudados, verificaram que 11 foram capazes de se multiplicar em salsichas de suíno fatiada, artificialmente contaminadas, e que algumas cepas atingiram contagens de 6 log UFC/g em 14 dias de armazenamento à 8 °C. Os autores concluíram que, dependendo do nível de contaminação do produto final, as leveduras podem se multiplicar durante o armazenamento e levar a produção de gás na embalagem, descoloração, produção de limo e sabores desagradáveis no alimento. Neste estudo, as contagens de bolores e leveduras atingiram valores de 5,1-6 log UFC/g ao final do experimento, exceto nas salsichas formuladas com fumaça líquida (**Figura 18**), observando-se também mudanças nas características do alimento, como aparecimento de limo na superfície e perda parcial do vácuo na embalagem.

Os resultados das contagens de bactérias lácticas nas amostras de salsicha formuladas com e sem lactato de sódio, imersas e não imersas em fumaça líquida, durante armazenamento a 8 °C, estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Contagens de bactérias lácticas (log UFC/g) nas salsichas formuladas com e sem lactato de sódio, imersas e não imersas em fumaça líquida, durante armazenamento a 8 °C.

Formulações	Tempo de armazenamento (dias)						
	0	1	2	8	14	21	28
Controle	<1	<1	<1	<1	1,47	1,49	1,81
Lac	<1	<1	<1	<1	1,86	2,05	2,13
FL	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
FL + Lac	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Controle: Sem adição de antimicrobiano.

Lac: Formulada com lactato de sódio (2%).

FL: Imersa em solução de fumaça líquida.

FL + Lac: Formulada com lactato de sódio (2%) e imersa em solução de fumaça líquida.

As contagens de bactérias lácticas em todas as formulações de salsichas ficaram abaixo do limite de detecção até o 8º dia de armazenamento à 8 °C. As contagens no 14º dia de armazenamento foram de 1,47 log UFC/g e 1,86 log UFC/g nas salsichas controle e nas salsichas formuladas com lactato de sódio, respectivamente. Após este aumento, verificou-se que as contagens de bactérias lácticas permaneceram estáveis até o final do experimento. Este resultado é semelhante ao obtido por Deda et al. (2007) que avaliaram a influência de nitrito de sódio e molho de tomate nas características sensoriais e microbiológicas de salsichas armazenadas à 4°C, e também apresentaram contagens de bactérias lácticas abaixo do limite de detecção até o sétimo dia, passando para 2,1 log UFC/g no 21º dia e para 3 log UFC/g no 31º dia de armazenamento. Esses resultados contrastam com os reportados por Samelis et al. (2000), que obtiveram contagens de bactérias lácticas de 2,7 log UFC/g em salsichas fabricadas em uma planta industrial, no primeiro dia de armazenamento à 4 °C, admitindo no entanto, que esta contaminação pós-processamento era alta em comparação à outros estudos.

Andrés et al. (2006) avaliaram a estabilidade de salsichas de frango com baixo teor de gordura, com adição de 0%, 2% e 5% de gordura bovina e concluíram que a taxa de multiplicação de bactérias lácticas foi menor nas salsichas formuladas com 5% de gordura do que nas salsichas sem gordura ou com 2% de gordura. Os resultados são explicados pelo fato de salsichas com maior teor de gordura possuírem menos umidade, criando um ambiente menos favorável à multiplicação de bactérias. O alto teor de gordura das salsichas formuladas neste experimento (> 18%) pode ter influenciado negativamente a multiplicação de bactérias lácticas.

O método de contagem de bactérias lácticas utilizado neste trabalho foi semelhante ao utilizado por Deda et al. (2007), que também adicionaram um antimicrobiano para inibir a multiplicação de leveduras no meio de cultura e minimizar erros na contagem. A maioria dos estudos utiliza somente ágar MRS para contagens de bactérias lácticas, mas neste trabalho este meio não foi suficientemente seletivo. Outro fator a considerar diz respeito a etapa de fixação da cor durante a fabricação das salsichas, que pode ter efeito antimicrobiano. Após a retirada da tripa de celulose, as salsichas foram coradas em uma solução de corante de urucum (5%) e a cor foi fixada em uma solução de ácido fosfórico (0,2%) em pH 2, por três minutos. Alguns estudos comprovam que as bactérias lácticas não mantêm boa viabilidade após serem submetidas

a valores de pH inferiores a 2 (Cotter & Hill, 2003; Monteagudo-Mera et al., 2012). Dykes et al. (1991) avaliaram a presença de bactérias lácticas em diversas etapas na fabricação de salsichas Viena e observaram que a população de bactérias lácticas nas salsichas após o cozimento era inferior a 1 log UFC/g e que após a depelagem manual as contagens aumentavam para 2,9 log UFC/g. Assim, pode-se considerar que houve eficiência no processamento térmico durante a fabricação de salsichas neste experimento e que a etapa de fixação da cor é mais um obstáculo para a multiplicação de bactérias. A realização de procedimentos de higiene operacional podem também ter contribuído para as baixas contagens de bactérias lácticas neste experimento.

4.3 pH e A_w das amostras de mortadela e salsichas *hot-dog*, armazenadas a 8 °C, ao longo do tempo de prateleira.

Os resultados dos valores de pH e de A_w das amostras de mortadela do primeiro e segundo lote de fabricação, armazenadas a 8 °C por até 30 dias estão apresentados nas **Figuras 19, 20, 21 e 22**.

Figura 19 – Valores de pH de mortadela fatiada embalada a vácuo com adição de lactato de sódio (vermelho), produto A (verde), produto B (roxo) e controle (azul), durante armazenamento a 8 °C por 30 dias. Primeiro lote.

Figura 20 – Valores de pH de mortadela fatiada embalada a vácuo com adição de extrato de alecrim (1A) (vermelho), nisina livre (2A) (verde), nisina encapsulada (3A) (roxo), nisina livre + nisina encapsulada (4A) (azul), nisina livre na mesma concentração de 4B (5A) (laranja) e sem adição de antimicrobiano (6A) (preto), durante armazenamento a 8 °C até 30 dias. Segundo lote.

Figura 21 – Valores de Aw de mortadela fatiada embalada a vácuo com adição de lactato de sódio (vermelho), produto A (verde), produto B (roxo) e controle (azul), durante armazenamento a 8 °C por 30 dias. Primeiro lote.

Figura 22 – Valores de A_w de mortadela fatiada embalada a vácuo com adição de extrato de alecrim (1A) (vermelho), nisina livre (2A) (verde), nisina encapsulada (3A) (roxo), nisina livre + nisina encapsulada (4A) (azul), nisina livre na mesma concentração de 4B (5A) (laranja) e sem adição de antimicrobiano (6A) (preto), durante armazenamento a 8 °C até 30 dias. Segundo lote.

Os resultados dos valores de pH e de A_w das amostras de salsichas do primeiro e do segundo lote de fabricação, armazenadas a 8 °C até 28 dias estão apresentados nas **Figuras 23, 24, 25 e 26**.

Figura 23 – Valores de pH de salsichas embaladas a vácuo formuladas com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida e lactato de sódio (roxo) e controle (azul), durante armazenamento a 8 °C por 28 dias. Primeiro lote.

Figura 24 – Valores de pH de salsichas embaladas a vácuo formuladas com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida e lactato de sódio (roxo) e controle (azul), durante armazenamento a 8 °C por 28 dias. Segundo lote.

Figura 25 – Valores de A_w de salsichas embaladas a vácuo formuladas com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida e lactato de sódio (roxo) e controle (azul), durante armazenamento a 8 °C por 28 dias. Primeiro lote.

Figura 26 – Valores de A_w de salsichas embaladas a vácuo formuladas com lactato de sódio (verde), fumaça líquida (vermelho), fumaça líquida e lactato de sódio (roxo) e controle (azul), durante armazenamento a 8 °C por 28 dias. Segundo lote.

Durante o armazenamento, houve pequena queda no valor de pH nas mortadelas formuladas com o Produto A (**Figura 19**), em comparação às outras formulações. Samelis et al. (2005) concluíram em seu estudo que a adição de nisina em mortadela não alterou o pH do alimento e que a redução no valor do pH observada ao

longo do tempo de prateleira foi causada pelo aumento da população de *L. monocytogenes*, responsável por converter carboidratos em ácidos orgânicos. Esse fato não foi observado neste estudo, pois as amostras que apresentaram pH mais baixo foram aquelas que tinham as contagens mais baixas do patógeno. É possível considerar que a redução do pH potencializou o efeito antimicrobiano da nisina, conhecida por ter melhor ação em meios ácidos. As mortadelas formuladas com os antimicrobianos que compõem o Produto A não apresentaram variação de pH, como observado na **Figura 20**. A adição de fumaça líquida e/ou lactato de sódio nas salsichas também não alterou o valor de pH, o qual permaneceu próximo de 6,2 durante todo período de armazenamento.

Os dois produtos cárneos estudados apresentaram A_w alta, variando entre 0,94 e 0,97. Entre estes, os produtos formulados com lactato de sódio apresentaram os valores mais baixos, como apresentado na **Figura 21, 25 e 26**. No entanto, os valores observados não são suficientes para inibir a multiplicação de *L. monocytogenes*, bactérias lácticas ou leveduras. Assim, acredita-se que as diferenças observadas nas contagens de *L. monocytogenes*, bactérias lácticas e leveduras sejam devidas à ação dos antimicrobianos adicionados aos alimentos.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que existem produtos comerciais capazes de diminuir a velocidade de multiplicação de *L. monocytogenes* em produtos cárneos prontos para consumo, mas que o controle efetivo do patógeno depende de uma série de ações que devem ser tomadas em todas as etapas de produção, pois a falta de microrganismos competidores, a temperatura de armazenamento a 8 °C e a longa vida de prateleira, permitem que a multiplicação do patógeno ocorra.

5 CONCLUSÕES

- O antimicrobiano comercial A em mortadela apresentou atividade contra *Listeria monocytogenes*, e a velocidade de multiplicação foi mais baixa do que nas mortadelas submetidas aos demais tratamentos, durante armazenamento à 8 °C.
- A fumaça líquida apresentou atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* nas salsichas, sendo que o controle do patógeno foi mais eficiente naquelas formuladas com lactato de sódio.
- A fumaça líquida apresentou atividade contra bolores e leveduras e foi capaz de controlar sua multiplicação durante 21 dias, em salsichas embaladas à vácuo e armazenadas à 8 °C.
- O antimicrobiano comercial A e a combinação fumaça líquida + lactato de sódio possuem potencial de aplicação em produtos cárneos embalados a vácuo, armazenados sob refrigeração, por contribuírem para o controle de *Listeria monocytogenes* nesses alimentos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHZADEH, E.; REZAEI, M.; HOSSEINI, H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 177–183, 2014.

ANDRADE, N.J.; MACEDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos**. Livraria Varela: São Paulo, 182p., 1996.

ANDRADE, S.C.; BARROS, M.B.A.; CARANDINA, L., GOLDBAUM, M.; CESAR, C.L.G.; FISBERG, R.M. Dietary Quality Index and Associated Factors among Adolescents of the State of Sao Paulo, **Brazilian journal of pediatric**, v. 156, n. 3, p. 456-460, 2010.

ANDRES, S.C.; GARCIA, M.E.; ZARITZKY, N.E.; CALIFANO, A.N. Storage stability of low-fat chicken sausages. **Journal of Food Engineering**, v. 72, p. 311–319, 2006.

ANONYMOUS, 2003. Microbiological challenge testing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chapter VI. 2S, p. 46-50, 2003.

ANONYMOUS, 2006. U.S. Department of Agriculture (USDA). Food Safety and Inspection Service (FSIS). Updated Compliance Guidelines May 2006. Compliance guidelines to control *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products.

ANONYMOUS, 2008. EU Community Reference Lab for *L. monocytogenes* EU Community Reference Lab for *L. monocytogenes* (2008). Working document November 2008. Technical Guidance Document on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; ARAGON, D.C.; MARTINEZ, E.Z.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Performance of a chromogenic medium for the

isolation of *Listeria monocytogenes* in food. **Food Control**, v. 19, n. 5, p. 483-486, 2008.

ASITA, A.O.; CAMPBELL, I.A. Anti-microbial activity of smoke from different woods. **Letters in Applied Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 93-95, 2008.

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

BINGOL, E.B.; BOSTAN, K. Effect of Sodium Lactate on the Microbiological Quality and Shelf Life of Sausages. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 31, n. 5, p. 333-339, 2007.

BLOUKAS, J.G.; PANERAS, E.D.; FOURNITZIS, G.C. Sodium lactate and protective culture effects on quality characteristics and shelf-life of low-fat frankfurters produced with olive oil. **Meat Science**, v. 45, n. 2, p. 223-238, 1997.

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

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa nº 51, de 29 de dezembro de 2006. Adota o Regulamento Técnico de Atribuição de Aditivos, e seus Limites das Categorias de Alimentos que especifica. Disponível em http://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-51-2006_76049.html Acesso em: 20/02/2014.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=4344> Acesso em: 20/02/2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). 1995. Portaria n° 771, de 1° de novembro de 1995. Normas técnicas de instalações e equipamentos para abate e industrialização de suínos. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/concursos/em_andamento/portarias/port%20711.doc Acesso em: 20/01/2014.

CAMARGO, DE R.J. Ação de bacteriocinas de bactérias lácticas no controle de *Listeria monocytogenes* e no aumento da vida de prateleira de mortadela fatiada. Tese. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2011.

CARTHY, T.L.; KERRY, J.P.; KERRY, J.F.; LYNCH, P.B.; BUCKLEY, D.J. Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. **Meat Science**, v. 67, n. 2, p.177-184, 2001.

CASTRO, A.P. Sobrevivência de bactérias aeróbias mesófilas, psicrotróficas, bactérias lácticas e *Listeria monocytogenes* em salsichas submetidas a tratamento com nisina. Dissertação. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.

CHOI, S.H.; CHIN, K.B. Evaluation of sodium lactate as a replacement for conventional chemical preservatives in comminuted sausages inoculated with *Listeria monocytogenes*. **Meat Science**, v. 65, n. 1, p. 531–537, 2003.

COLE, M.B. (2001). Introduction. In Moir, C.J. **Spoilage of processed food: Causes and diagnosis**. Food Microbiology Group of Australian Institute of Food Science and Technology (AIFST). 4 p., 2001.

COTTER, P.D.; HILL, C. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 429-453, 2003.

CRUZ, C.D., SILVESTRE, F.A., KINOSHITA, E.M., LANDGRAF, M., FRANCO, B.D.G.M., & DESTRO, M.T. Epidemiological Survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p.375-383, 2008.

DEDA, M.S.; BLOUKAS, J.G.; FISTA, G.A. Effect of tomato paste and nitrite level on processing and quality characteristics of frankfurters. **Meat Science**, v. 76, n. 3, p. 501-508, 2007.

DIMITRIJEVIĆ, S.I.; MIHAJLOVSKI, K.R.; ANTONOVIĆ, D.G.; MILANOVIĆ-STEVANOVIC, M.R.; MIJIN, D.Z. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 774–782, 2007.

DOORDUYN, Y.; DE JAGER, C.M.; VAN DER ZWALUW, W.K.; WANNET, W.J.B.; VAN DER ENDE, A.; SPANJAARD, L.; VAN DUYNHOVEN Y.T.H.P. Invasive *Listeria monocytogenes* infections in the Netherlands, 1995–2003. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 25, n. 7, p. 433-42, 2006.

DOULGERAKI, A.I.; ERCOLINI, D.; VILLANI, F.; NYCHAS, G-J. 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, 2012.

DYKES, G.A.; CLOETE, T.E.; VON HOLY, V. Quantification of microbial populations associated with the manufacture of vacuum-packaged, smoked vienna sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 239-48, 1991.

ERDMANN, J. Antimicrobials in Meats. Manager of Food Protection, Danisco - USA; 2011 [cited 2012 Jul 17]. Available from: <http://www.cmc-cvc.com/english/documents/Tab4-2DuPont2011.pdf>

ETTAYEBI, K.; YAMANI, J.E.; ROSSI-HASSANI, B. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. **FEMS microbiology letters**, v. 183, n. 1, p. 191-195, 2000.

FARBER, J.M., PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FARIA-TISCHER, P.C.S.; TISCHER, C.A. Nanobiotechnology: platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. Review. BBR - **Biochemistry and Biotechnology Reports**. v. 1, n. 1, p. 32-53, 2012.

FORSYTHE, Stephen J. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre: Artmed, 2005.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. Review. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 1–15, 2007.

GAO, M.; FENG, L.; JIANG, T.; ZHU, J.; FU, L.; YUAN, D.; LI, J. The use of rosemary extract in combination with nisin to extend the shelf life of pompano (*Trachinotus ovatus*) fillet during chilled storage. **Food Control**, v. 37, p. 1–8, 2014.

GEDELA, S.; ESCOUBAS, J.R.; MURIANA, P.M. Effect of inhibitory liquid smoke fractions on *Listeria monocytogenes* during long-term storage of frankfurters. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 2, p. 386-91, 2007.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. Agentes bacterianos de toxinfecções. 3^a ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2008.

GERNER-SMIDT, P.; ETHELBERG, S.; SCHIELLERUP, P.; CHRISTENSEN, J.J.; ENGBERG, J.; FUSSING, V.; JENSEN, A.; JENSEN, C.; PETERSEN, A.M.; BRUUN, B.G. Invasive listeriosis in Denmark 1994-2003: A review of 299 cases with special emphasis on risk factors for mortality. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 8, p. 618-624, 2005.

GORMLEY, F.J.; LITTLE, C.L.; GRANT, K.A.; PINNA, E.; MCLAUCHLIN, J. 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 Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 243-249, 2010.

GRAU, F.H. (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., 2001.

GUILBAUD, M.; CHAFSEY, I.; PILET, M.F.; LEROI, F.; PRÉVOST, H.; HÉBRAUD, M.; DOUSSET, X. Response of *Listeria monocytogenes* to liquid smoke. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6 p. 1744-1753, 2008.

GUILLÉN, M.D.; MANZANOS, M.J. Study of the components of a solid smoke flavouring preparation. **Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 251-7, 1996.

HOFER, E.; NASCIMENTO, R.S.; OLIVEIRA, M.A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p. 173-177, 1998.

HOFER, E.; REIS, C.M.F.; HOFER, C.B. 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, 2006.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 273-92, 2005.

HOUTSMA, P.C.; WIT, J.C.; ROMBOUTS, F.M. Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms occurring in meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 247-257, 1993.

ISO 11290:1996 Amendment 1:2004: Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Microbiology of food and animal feeding stuffs. International Organization for Standardization, Ginebra.

ISO 15214:1998. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30 °C. In International standards. Microbiology of food and animal feeding stuffs. International Organization for Standardization, Ginebra.

KESKINEN, L.A.; TODD, E.C.D.; RYSER, E.T. 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, 2008.

LANDGRAF, I.M.; KOBATA, A.M.M.; JAKABI, M.; KIRSHBAUM, C.R.A.; MARCHI, C.R. Surto de meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 1, p. 63-67, 1999.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, n. 1-3, p. 181–186, 2000.

LIN, K.W.; LIN, S.N. Effects of sodium lactate and trisodium phosphate on the physicochemical properties and shelf life of low-fat Chinese-style sausage. **Meat Science**, v. 60, n. 2, p.147–154, 2002.

MACA, J.V.; MILLER, R.K.; ACUFF, G.R. Microbiological, Sensory and Chemical Characteristics of Vacuum-Packaged Ground Beef Patties Treated with Salts of Organic Acids. **Journal of Food Science**, v. 62, n.3, p. 591-596, 1997.

MALHEIROS, P.S.; SANT'ANNA, V.; BARBOSA, M.S.; BRANDELLI, A.; FRANCO, B.D.G.M. Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 272-277, 2012.

MANGALASSARY, S.; HAN, I.; RIECK, J.; ACTON, J.; DAWSON, P. Effect of combining nisin and/or lysozyme with in-package pasteurization for control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat turkey bologna during refrigerated storage. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 9, p. 2503-2511, 2007.

MARTIN, E.M.; O'BRYAN, C.A.; LARY, R.Y. JR.; GRIFFIS, C.L.; VAUGHN, K.L.; MARCY, J.A.; RICKE, S.C.; CRANDALL, P.G. Spray application of liquid smoke to reduce or eliminate *Listeria monocytogenes* surface inoculated on frankfurters. **Meat Science**, v. 85, n. 4, p. 640-4, 2010.

MATARAGAS, M.; DROSINOS, E.H.; VAIDANIS, A.; METAXOPOULOS, I. 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, 2006.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 607-625, 1999.

MILLY, P.J.; TOLEDO, R.T.; RAMAKRISHNAN, S. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Liquid Smoke Fractions. **Journal of Food Science**. v. 70, n. 1, p.12-17, 2005

MONTEAGUDO-MERA, A.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L.; RÚA, J.; MARTÍNEZ-BLANCO, H.; NAVASA, N.; GARCÍA-ARMESTO, M.R.; FERRERO, M.A. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 2, p. 531-541, 2012.

MONTEIRO, C.A.; LEVY, R.B.; CLARO, R.M.; CASTRO, I.R.; CANNON, G. Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: evidence from Brazil. **Public Health Nutrition**, v. 14, n. 1, p. 5-13, 2011.

MOREY, A. Efficacy of Liquid Smoke as an Ingredient in Hotdogs against *Listeria monocytogenes* and its Effects on the Microbial Shelf-life and Quality Attributes [tese]. Alabama : Faculty of Auburn University; May 06, 2012.

NIELSEN, D.S.; JACOBSEN, T.; JESPERSEN, L.; KOCH, A.G.; ARNEBORG, N. Occurrence and growth of yeasts in processed meat products – Implications for potential spoilage. **Meat Science**, v. 80, n. 3, p. 919–926, 2008.

NYCHAS, G-J. E.; SKANDAMIS, P.N.; TASSOU, C.C.; KOUTSOUMANIS, K.P. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, v. 78, n. 1-2, p. 77-89, 2008.

O'GRADY, M.N.; KERRY, J.P. Prevention of quality deterioration in meat and poultry. In Skibsted, L.H. Chemical deterioration and physical instability of food and beverages. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 711 p., 2010.

RANTSIOU K., MATARAGAS M., JESPERSEN L., COCOLIN L. Understanding the behavior of foodborne pathogens in the food chain: New information for risk assessment analysis. **Trends Food Science Technology**, v. 22: S21-S29, 2011.

REUNANEN, J.; SARIS, P.E.J. Bioassay for nisin in sausage; a shelf life study of nisin in cooked sausage. **Meat Science**, v. 66, n. 3, p. 515–8, 2004.

RICHARDSON, K.C. (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., 2001.

ROBERTO, C.D.; BRANDÃO, S.C.C.; DA SILVA, C.A.B. Costs and investments of implementing and maintaining HACCP in a pasteurized milk plant. **Food Control**, v. 17, n. 8, p. 599–603, 2006.

SALLAMA, KH. I.; SAMEJIMAB, K. Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 37, n. 8, p. 865–871, 2004.

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

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. **Food Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 329-340, 2000.

SÃO PAULO. CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVE). 2013. Divisão de doenças de transmissão hídrica e alimentar - DDTHA. Disponível em : http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/hidri_estat.html Acesso em 15/01/2014

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSON, M.A.; ROY, S.L.; JONES, J.L. GRIFFIN, P.M. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerging Infectious Diseases** , v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I.A. 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, 2003.

SENCZEK, D.; STEPHAN, R.; UNTERMANN, F. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1-2, p. 155–159, 2000.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of lactates: a review. **Journal Food Protection**, v. 57, p. 445–450, 1994.

SINGH, A.; SINGH, R.K.; BHUNIA, A.K. SINGH N. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 8, p. 787-794, 2003.

SOFOS, J.N.; GEORNARAS, I. 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, 2010.

STASIEWICZ, M.J.; WIEDMANN, M.; BERGHOLZ, T.M. The Transcriptional Response of *Listeria monocytogenes* during Adaptation to Growth on Lactate and Diacetate Includes Synergistic Changes That Increase Fermentative Acetoin Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5294–5306, 2011.

SUIHKO, M.L.; SALO, S.; NICLASSEN, O.; GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; TORHELSSON, G.; BREDHOLT, S.; SJÖBERG, A.M.; GUSTAVSSON, P. 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, 2002.

SUÑEN, E.; ARISTIMIÑO, C.; FERNANDEZ-GALIAN, B. Activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout stored at 4°C. **Food Research International**, v. 36, n. 2, p. 111–116, 2003.

SWAMINATHAN, B., GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v. 9, n.10, p. 1236–1243, 2002.

VON LAER, A.E.; LIMA, A.S.; TRINDADE, P.S.; ANDRIGUETTO, C.; DESTRO, M.T.; SILVA, W.P. 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, 2009.

VOTE, D.J.; PLATTER, W.J.; TATUM, J.D.; SCHMIDT, G.R.; BELK, K.E.; SMITH, G.C.; SPEER, N.C. Injection of beef strip loins with solutions containing sodium tripolyphosphate, sodium lactate, and sodium chloride to enhance palatability. **Journal Animal Science**, v. 78, n. 4, p. 952-957, 2000.

VURMA, M.; CHUNG, Y.K.; SHELLHAMMER, T.H.; TUREK, E.J.; YOUSEF, A.E. Use of phenolic compounds for sensitizing *Listeria monocytogenes* to high-pressure processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 263-9, 2006.

WANG, F.S. Effects of three preservative agents on the shelf life of vacuum packaged Chinese-style sausage stored at 20°C. **Meat Science**, v. 56, n. 1, p. 67-71, 2000.

ZHU, M.; DU, M.; CORDRAY, J.; AHN D.U. Control of *Listeria monocytogenes* Contamination in Ready-to-Eat Meat Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 4, n. 2, p. 34-42, 2005.