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

Ação de bacteriocinas de bactérias lácticas no controle de *Listeria monocytogenes* e no aumento da vida de prateleira de mortadela fatiada

Rita Junqueira de Camargo

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

São Paulo
2011

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

Ação de bacteriocinas de bactérias lácticas no controle de *Listeria monocytogenes* e no aumento da vida de prateleira de mortadela fatiada

Rita Junqueira de Camargo

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

São Paulo
2011

Versão Corrigida

Ficha Catalográfica

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

Camargo, Rita Junqueira de
C172a Ação de bacteriocinas de bactérias lácticas no controle de
Listeria monocytogenes e no aumento da vida de prateleira de
mortadela fatiada / Rita Junqueira de Camargo. -- São Paulo,
2011.
72p.

Tese (doutorado) - 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 2. Alimentos : Conservação :
Tecnologia 3. Bacteriocinas : Microbiologia de alimentos I. T.
II. Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo, orientador.

664.07 CDD

Rita Junqueira de Camargo

Ação de bacteriocinas de bactérias lácticas no controle de *Listeria monocytogenes* e no aumento da vida de prateleira de mortadela fatiada

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Bernadette D.G.M. Franco
orientador/presidente

Elaine Cristina Pereira De Martinis
1º. examinador

Maristela da Silva do Nascimento
2º. examinador

Cynthia Jurkiewicz Kunigk
3º. examinador

Mariza Landgraf
4º. examinador

São Paulo, 20 de Julho de 2011

*Aos meus pais pela constante orientação, sempre tão
presentes nas nossas vidas, por serem exemplos de
dedicação em tudo que realizam.*

*Ao Ricardo, meu marido, que com muita paciência me apóia e
participa de todas as minhas decisões.*

Ao Felipe, que de dentro da barriga já me faz tanta companhia.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Bernadette D.G.M. Franco, pela orientação e dedicação e todas as oportunidades que me proporcionou durante o doutorado.

Ao Matheus Barbosa pela ajuda indispensável e incansável nas realizações dos experimentos.

À Verena Capuano, por me manter longe da *Listeria monocytogenes* no final dos experimentos.

À Maria Crystina Igarashi pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao pesquisador Svetoslav Dimitrov Todorov, pela orientação e apoio nos experimentos de biologia molecular.

À prof. Dra. Mariza Landgraf pelas oportunidades proporcionadas durante o curso de doutorado e sugestões e críticas realizadas durante a banca de qualificação.

À prof. Maria Teresa Destro pela atenção, convívio e oportunidade de aprendizado.

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

Aos colegas de laboratório Adriana, Anderson, Carol, Haíssa, Janaína, Maria Crystina, Maria Fernanda, Matheus, Patrícia, Priscila T., Priscila A., Rafael, Vanessa, Verena e Vinicius pela companhia, pelos bons momentos de descontração e pelo ótimo ambiente de trabalho do nosso laboratório.

Às funcionárias do laboratório Kátia e Lúcia pelo apoio, auxílio nos experimentos, e por ajudarem a manterem a ordem no laboratório.

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

Ao Getulio Takahashi e ao Milton Fonseca, colegas da Sadia que tanto incentivaram a minha continuidade na vida acadêmica, mesmo quando ainda paralelamente as atividades exercidas na indústria.

Ao Lucas, meu afilhado e sobrinho querido, pelos momentos tão felizes que tem nos proporcionado.

À minha família: meu marido, Ricardo, meus pais, Monica e Pedro, irmãos Tomás e Lia, e cunhados Gabriela e Carlos, pelo constante apoio em tudo que realizo.

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

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Produtos cárneos fatiados: aspectos microbiológicos.....	3
1.2. <i>Listeria monocytogenes</i> como patógeno de relevância em produtos cárneos fatiados.....	4
1.3. Bacteriocinas de bactérias lácticas.....	9
1.4. Aplicação de bacteriocinas em produtos cárneos	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas ativas contra <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A a partir de mortadela fatiada.....	16
3.1.1. Verificação da atividade inibitória do sobrenadante: Teste de antagonismo <i>spot-on-the-lawn</i>	18
3.1.2. Verificação da natureza protéica da substância responsável pela atividade inibitória do sobrenadante.....	18
3.2. Caracterização das bacteriocinas presentes nos sobrenadantes das culturas de BAL.....	19
3.2.1. Determinação da estabilidade das bacteriocinas em diferentes pH	20
3.2.2. Determinação do espectro de ação das bacteriocinas.....	20
3.2.3. Determinação da estabilidade térmica das bacteriocinas	22
3.2.4. Determinação da resistência das bacteriocinas ao NaCl e a agentes químicos	23
3.3. Identificação das bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas	23
3.4. Seleção do isolado produtor de bacteriocinas e obtenção da bacteriocina semi purificada para aplicação na mortadela fatiada.....	25
3.4.1. Otimização da produção das bacteriocinas	25
3.4.2. Obtenção da bacteriocina parcialmente purificada para os testes <i>in situ</i>	26
3.4.3. Determinação do peso molecular da bacteriocina parcialmente purificada.....	26
3.5. Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> da bacteriocina parcialmente purificada frente à <i>L. monocytogenes</i>	27
3.6. Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in situ</i> da bacteriocina parcialmente purificada em mortadela fatiada experimentalmente contaminada	28

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas ativas contra <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A a partir de mortadela fatiada	31
4.2. Caracterização das bacteriocinas presentes nos sobrenadantes das culturas de BAL	32
4.2.1. Determinação da estabilidade das bacteriocinas em diferentes pH	32
4.2.2. Determinação do espectro de ação das bacteriocinas	33
4.2.3. Determinação da resistência térmica da bacteriocina	38
4.2.4. Determinação da resistência ao sal e a agentes químicos	39
4.3. Identificação das bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas	40
4.4. Seleção do isolado produtor de bacteriocinas e obtenção da bacteriocina semi purificada para aplicação na mortadela fatiada	42
4.4.1. Otimização da produção das bacteriocinas	42
4.4.2. Obtenção da bacteriocina parcialmente purificada para os testes <i>in situ</i>	45
4.4.3. Determinação do peso molecular	45
4.5. Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da bacteriocina parcialmente purificada frente à <i>Listeria monocytogenes</i>	47
4.6. Avaliação da atividade <i>in situ</i> da bacteriocina parcialmente purificada frente à <i>Listeria monocytogenes</i> em mortadela fatiada experimentalmente contaminada	52
5. CONCLUSÕES	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Microrganismos e condições experimentais utilizados no teste de determinação do espectro de ação da bacteriocina	21
Tabela 2: Origem dos isolados de BAL produtores de bacteriocina e características das amostras de mortadela.....	31
Tabela 3: Efeito do pH na atividade antimicrobiana (UA/mL) dos sobrenadantes livres de células dos isolados de BAL produtores de bacteriocina.....	32
Tabela 4: Tamanho do halo de inibição (cm) no teste spot-on-the-lawn para cada sobrenadante de BAL contendo bacteriocinas, de acordo com o micro-organismo indicador testado	34
Tabela 5: Número de micro-organismos inibidos pelos 19 isolados de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas, em um total de 74 micro-organismos testados	37
Tabela 6: Efeito da temperatura na atividade antimicrobiana (UA/mL) dos sobrenadantes livres de células dos isolados de BAL produtores de bacteriocina.....	38
Tabela 7: Efeito de diferentes concentrações de NaCl na atividade antimicrobiana (UA/mL) sobrenadantes livres de células dos isolados de BAL produtores de bacteriocina, a 7°C e 37°C.....	39
Tabela 8: Efeito de diferentes compostos químicos na atividade antimicrobiana (UA/mL) sobrenadantes livres de células dos isolados de BAL produtores de bacteriocina	40
Tabela 9: Identificação dos isolados de BAL produtores de bacteriocinas por seqüenciamento do gene 16s, segundo GenBank	41
Tabela 10: Características físico-químicas da amostra de mortadela fatiada utilizada nos experimentos.....	53
Tabela 11: Enumeração* de <i>L. monocytogenes</i> nas fatias de mortadela artificialmente contaminadas, adicionadas (teste T4) e não adicionadas (Teste T3) da bacteriocina parcialmente purificada produzida pelo isolado <i>L. curvatus</i> RJC 1, durante armazenamento em refrigeração.....	55
Tabela 12: Enumeração de bactérias lácticas nas fatias de mortadela para os testes T1, T2, T3, e T4	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma de isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas a partir de mortadela fatiada	16
Figura 2. Esquema dos testes de caracterização das bacteriocinas produzidas pelas BAL e da seleção do isolados produtores de bacteriocina	19
Figura 3: Gel corado com brometo de etídio, após eletroforese dos produtos de PCR quando utilizado primer específico para a espécie <i>L. sakei</i> . CP: controle positivo; CN: controle negativo	42
Figura 4: Gel corado com brometo de etídio, após eletroforese dos produtos de PCR quando utilizado primer específico para a espécie <i>L. curvatus</i> . CP: controle positivo; CN: controle negativo	42
Figura 05: Multiplicação (curvas à esquerda) e produção de bacteriocina (barras à direita) pelos isolados de BAL (1, 4 e 16), de acordo com a temperatura (25oC, 30oC e 37°C). Cada ponto representa a media de três repetições.....	43
Figura 06: Multiplicação (curvas à esquerda) e produção de bacteriocina (barras à direita) a 25oC, 30oC e 37°C, de acordo com o isolado de BAL. Cada ponto representa a media de três repetições.....	44
Figura 7: SDS-PAGE indicando o peso molecular da bacteriocina produzida por <i>L. curvatus</i> RJC 1. A) após incubação com sobrecamada de BHI semisólido contendo <i>L. monocytogenes</i> Scott A; B) após coloração com Comassie Blue.....	45
Figura 8: Multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> Scott A em caldo BHI, na presença e ausência da bacteriocina semi-purificada produzida por <i>L. curvatus</i> RJC 1.....	47
Figura 9: Multiplicação de diferentes cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas de salsicha, em caldo BHI, na presença e ausência da bacteriocina semi-purificada produzida por <i>L. curvatus</i> RJC 1	48
Figura 10: Multiplicação de diferentes cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas de presunto, em caldo BHI, na presença e ausência da bacteriocina semi-purificada produzida por <i>L. curvatus</i> RJC 1	49
Figura 11: Multiplicação de cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas de salsicha e presunto, agrupadas em dois pools, em caldo BHI, na presença e ausência da bacteriocina semi-purificada produzida por <i>L. curvatus</i> RJC 1	
Pool 1: isolados 512, 541, 571, 592 e 613 (salsicha) e 90, 108, 179, 268 e 112 (presunto)	
Pool 2: isolados 592, 613, 649, 628 e 611(salsicha) e 205, 106, 112, 268 e 90 (presunto)	50
Figura 12: Multiplicação do pool de <i>L. monocytogenes</i> em diferentes inóculos iniciais (100, 102, 104 e 106 UFC/mL), em caldo BHI contendo diferentes concentrações (0, 600, 1080 e 2048 UA/mL) da bacteriocina parcialmente purificada produzida pelo isolado <i>L. curvatus</i> RJC 1	51
Figura 13: Efeito de diferentes concentrações da bacteriocina parcialmente purificada produzida pelo isolado <i>L. curvatus</i> RJC 1 na multiplicação do pool de <i>L. monocytogenes</i> em diferentes concentrações iniciais (106, 104, 102, 100 UFC/mL).....	51

Figura 14: Multiplicação do pool de *L. monocytogenes* nas amostras de mortadela fatiada tratadas com diferentes concentrações da bacteriocina parcialmente purificada produzida pelo isolado *L. curvatus* RJC 1.....52

Figura 15: Multiplicação do pool de *L. monocytogenes* nas amostras de mortadela fatiada adicionadas (Teste 4) e não adicionadas (Teste 3) da bacteriocina parcialmente purificada produzida pelo isolado *L. curvatus* RJC 1).....54

Figura 16: Enumeração de bactérias lácticas nas amostras de mortadela fatiada durante armazenamento em refrigeração onde Teste 1: Controle (sem bacteriocina, sem *L. monocytogenes*); Teste 2: Com bacteriocina, sem *L. monocytogenes*; Teste 3: Sem bacteriocina, com *L. monocytogenes*; e Teste 4: Com bacteriocina, com *L. monocytogenes*54

RESUMO

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

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos por algumas bactérias, que atuam como bio-conservantes e têm grande potencial de aplicação em produtos cárneos. Estudos mostram que as bacteriocinas de bactérias lácticas (BAL) a serem utilizadas em um determinado alimento são mais eficientes quando produzidas por bactérias lácticas isoladas do mesmo tipo de alimento. Este estudo objetivou obter novas BAL produtoras de bacteriocinas a partir de mortadela fatiada, caracterizar as bacteriocinas produzidas, obter a bacteriocina semi-purificada e verificar seu potencial de aplicação *in vitro* e *in situ* no controle de *Listeria monocytogenes* e na vida de prateleira (VDP) de mortadela fatiada. Foram obtidos 19 isolados de BAL comprovadamente produtoras de bacteriocinas, que foram avaliadas quanto ao espectro de ação frente a uma grande variedade de bactérias Gram positivas e Gram negativas, e estabilidade em diferentes pH. As que apresentaram melhor estabilidade e inibiram maior número de bactérias foram avaliadas quanto a estabilidade térmica e resistência a diferentes agentes químicos e concentrações de NaCl. As que apresentaram maior resistência foram submetidas a testes de otimização da produção da bacteriocina em diferentes combinações de tempo/temperatura. Com base nestes resultados, selecionou-se um isolado que identificado como *Lactobacillus curvatus* pelo sequenciamento do gene 16S e confirmado por reações de PCR com primers específicos. A bacteriocina produzida por este isolado foi submetida a uma purificação por extração ácida e aplicada em fatias de mortadela experimentalmente contaminadas com um pool de cepas de *Listeria monocytogenes*, observando-se as contagens deste patógeno durante o armazenamento em refrigeração (7°C) por 40 dias em embalagem à vácuo. Paralelamente, foi realizada contagem de bactérias lácticas para avaliar o efeito da bacteriocina nesta população, responsável pela VDP deste produto. A bacteriocina parcialmente purificada foi capaz de reduzir em 1 ciclo logarítmico a população inicial de *Listeria monocytogenes* na mortadela fatiada, que foi mantida durante os

40 dias de análise. Durante toda a VDP, a contagem de *L. monocytogenes* permaneceu constante, sem multiplicação nas condições de armazenamento do produto tanto nas amostras testes quanto controle. A bacteriocina semi-purificada não teve ação inibitória contra as bactérias lácticas presentes no produto e portanto não teve impacto na VDP do produto. Os resultados indicaram que a bacteriocina produzida pelo isolado *L. curvatus* RJC 1 apresenta potencial de aplicação em produtos cárneos fatiados como bioconservante.

Palavras chave: Bacteriocinas, bactérias lácticas, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus curvatus*, frios fatiados.

ABSTRACT

CAMARGO, R.J. **Use of bacteriocins from lactic acid bacteria in the control of *Listeria monocytogenes* and in the shelf life extension of sliced Mortadella.** Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011

Bacteriocins are peptides with antimicrobial properties produced by some bacteria, that act as bio-preservatives with great potential of application in meat products. Several studies show that bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB) to be used in a specific food product have a better performance when produced by LAB isolated from the same kind of product. This study aimed to obtain new bacteriocinogenic LAB from sliced Bologna, to characterize the bacteriocins produced, to obtain a semi-purified bacteriocin, and to verify its potential of application *in vitro* and *in situ* in the control of *Listeria monocytogenes* and in the shelf-life of sliced bologna. 19 bacteriocin producer LAB, were evaluated as to spectrum of action against a great variety of Gram positives and Gram negatives bacteria and pH stability. The ones with better stability and that inhibited a larger number of bacteria were evaluated according to its thermal stability and resistance against different chemical agents and NaCl concentrations. The ones that showed better resistance were submitted to tests to optimize the bacteriocin production in different combinations of time and temperature. Based on these results, one was selected, identified as *Lactobacillus curvatus* by gene 16S sequencing and confirmed by PCR reactions with specific primers. The bacteriocin produced by this strain was submitted to partial purification by acid extraction and was applied in mortadella slices experimentally contaminated with a pool of *L. monocytogenes* strains, observing the counts of this pathogen along refrigerated (7°C) storage for 40 days in vacuum package. Parallel, it was done LAB counts to evaluate the effect of the bacteriocin on this population, responsible for limiting the shelf life of this product. The semi-purified bacteriocin was able to reduce 1 log cycle of the initial population of *L. monocytogenes* in the sliced mortadella, which was maintained during the 40 days of analysis. Along the whole shelf-life, the counts of *L. monocytogenes* remained constant, without multiplication in the storage conditions in the test samples as well as in the control samples. The semi-purified bacteriocin did not act against the LAB naturally present at the product, having no impact in the shelf life of the product. The results indicated that the bacteriocin

produced by the isolated *L. curvatus* RJC 1 presents potential of application in sliced deli products as a bio-preservative.

Key-words: Bacteriocins, lactic acid bacteria, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus curvatus*, sliced meat products.

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos recentes avanços nos processos de fabricação de alimentos e no entendimento do controle e da ação dos microrganismos, e da existência de legislações mais rigorosas para a produção de alimentos, a conservação de alimentos ainda é um tema que requer muita atenção e que exige investigação e atualização constantes. Como destacado por Rantsiou *et al.* (2011), o controle de microrganismos patogênicos ao longo da cadeia de alimentos continua sendo um grande desafio para produtores, autoridades e consumidores.

A importância do assunto pode ser comprovada pelos dados do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, que indicam a ocorrência de 11770 casos, 502 surtos e 2 óbitos causados por Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em 2010 (SÃO PAULO, 2011). Sabe-se que esses valores são subestimados, pois grande parte da população não recorre aos sistemas de saúde quando tem um problema dessa natureza.

Além de ser uma questão de saúde pública, as DTA são também um problema econômico tendo em vista os prejuízos causados à sociedade e ao setor produtivo. Segundo Roller (2003), as perdas econômicas anuais relacionadas a doenças transmitidas por alimentos são da ordem de US\$ 6 bilhões nos Estados Unidos e de £ 745 milhões na Inglaterra.

Os microrganismos podem entrar na cadeia de alimentos em diversos pontos e são extremamente versáteis, podendo facilmente se adaptar ao meio, sobreviver, multiplicar e produzir substâncias tóxicas. Um dos desafios para os gestores de riscos microbiológicos em alimentos é garantir a segurança dos alimentos através do estabelecimento de controles efetivos, sem necessariamente aumentar os custos ou comprometer o valor nutricional e as características sensoriais dos alimentos (HAVELAAR *et al.*, 2010).

Para Roller (2003), cabe aos cientistas da área desenvolver novos sistemas de conservação de alimentos que garantam qualidade e proporcionem o aumento da vida-de-prateleira do alimento, sem comprometer suas características originais.

A busca por alimentos submetidos a tratamentos mais brandos vem sendo estimulada pelo crescente movimento a favor de produtos mais naturais e orgânicos, sendo este o setor que mais cresceu na indústria alimentícia na última década (THERON e LUES, 2007). A intensificação das atividades diárias dos consumidores,

com consequente redução do tempo disponível para o preparo das refeições, aumenta a demanda por produtos prontos ou semi-prontos para o consumo. No entanto, Havelaar *et al.* (2010) ressaltam que a busca por alimentos com estas características, consumidos sem tratamento térmico antes da ingestão, aumenta o risco dos consumidores em contraírem DTA.

Frente a essa nova realidade, a indústria de alimentos depara-se com um amplo campo para investigações. Paralelamente à superação dos obstáculos vitais, que incluem a prevenção de prejuízos econômicos relativos à perda de alimentos deteriorados e à transmissão de microorganismos patogênicos ao longo da cadeia de alimentos, a indústria tem buscado atender a crescente demanda dos consumidores por alimentos prontos para o consumo, frescos, ricos em vitaminas e nutrientes, minimamente processados e seguros (GÁLVEZ *et al.* 2007). Neste contexto, merecem destaque os produtos cárneos fatiados, como presunto, mortadela, salame e outros, frequentemente contaminados por microorganismos patogênicos resistentes ao sal e capazes de multiplicar durante armazenamento em refrigeração, como *Listeria monocytogenes*. Em estudo realizado em São Paulo, Bersot *et al.* (2008) chamaram a atenção para o risco microbiológico associado à mortadela fatiada embalada a vácuo, pois foi observado que 100% das amostras analisadas foram positivas para *L. monocytogenes*. A crescente demanda por produtos com vida de prateleira longa, que favorece a multiplicação desse microorganismo, somado ao aumento do consumo de alimentos prontos para consumo na nossa sociedade atual pode intensificar a exposição humana à *L. monocytogenes*, o que é ainda mais preocupante quando é constatado o aumento do segmento da população que é mais suscetível ao micro-organismo (IVANEK *et al.* 2004).

A multiplicação de microorganismos em alimentos é influenciada pela interação entre fatores intrínsecos (atividade de água, pH, potencial redox, composição química, presença de antimicrobianos e microbiota presente) e extrínsecos (temperatura, umidade e atmosfera). O uso racional desses fatores constitui a base da “tecnologia dos obstáculos”, responsável pelo prolongamento da vida de prateleira e pela prevenção da multiplicação de patógenos e/ou produção de toxinas nos alimentos (DE MARTINIS *et al.*, 2002).

Novas estratégias para conservação de alimentos vêm ganhando crescente atenção, com destaque para a bioconservação (MATARAGAS *et al.*, 2003). Neste processo, a multiplicação de microorganismos patogênicos e deteriorantes nos

alimentos é controlada por metabólitos antimicrobianos produzidos por bactérias naturalmente presentes, como as bactérias lácticas (NASCIMENTO *et al.*, 2008). A bioconservação constitui uma forma natural de controlar o desenvolvimento microbiano, e sua importância vem crescendo significativamente devido ao seu potencial como um substituto natural para conservantes químicos (SOOMRO *et al.*, 2002). A bioconservação pode ser uma alternativa também quando as boas práticas de fabricação, higienização e APPCC, executadas nas indústrias de alimentos não são suficientes para prevenir a presença e inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (THERON E LUES, 2007).

1.1. Produtos cárneos fatiados: aspectos microbiológicos

Produtos cárneos comercializados pré-fatiados pelos fabricantes, além de atenderem as exigências de mercado por produtos com grande praticidade para o consumidor, garantem aos fabricantes que, no momento do consumo, os produtos apresentam as características de qualidade esperadas. Como não há nenhuma intermediação, não há comprometimento da qualidade dos produtos, viabilizando sua comercialização em estabelecimentos que não dispõem dos equipamentos e condições necessários para o fatiamento. Segundo Weiss *et al.* (2010), os consumidores preferem produtos fatiados pelas indústrias em relação aos fatiados nos estabelecimentos de venda, devido à maior vida de prateleira que esses produtos oferecem em consequência de melhores condições de higiene durante preparo e embalagem à vácuo ou em atmosfera modificada.

Produtos cárneos cozidos são pouco ácidos ($\text{pH} > 6$), apresentam alta atividade de água (0,98 a 0,99) e, geralmente, baixo teor de sal ($< 2\%$), que são características que não inibem a multiplicação de bactérias deteriorantes (MATARAGAS E DROSINOS, 2007). A etapa de fatiamento destes produtos aumenta o risco de contaminação microbiana, devido à manipulação e ao contato com superfícies inadequadamente higienizadas. Gálvez *et al.* (2007) ressaltam ainda que a falta de microrganismos competidores devida ao cozimento favorece a multiplicação dos microrganismos decorrentes da contaminação pós-processamento. Além disso, o processo de fatiamento causa um aumento da superfície de contato com manipuladores e equipamentos, e a probabilidade de contaminação é também maior.

Os produtos cárneos fatiados presentes no mercado brasileiro têm entre 30 e 60 dias de validade, variando de acordo com o fabricante, características do produto e temperatura de conservação recomendada na embalagem. Há uma constante busca por alternativas tecnológicas que permitam uma extensão desta vida-de-prateleira, permitindo que mercados mais longínquos possam ser alcançados, garantindo maior número de consumidores com acesso aos benefícios dos produtos cárneos fatiados pelo próprio fabricante. Devido às grandes distâncias entre fábricas, centros de distribuição e pontos de venda, a logística necessária é cara, pois precisa ser extremamente eficiente. Vale ressaltar que grandes estabelecimentos de venda recusam produtos com mais de 1/3 da vida-de-prateleira já decorrido.

1.2. *Listeria monocytogenes* como patógeno de relevância em produtos cárneos fatiados

Além da dificuldade relacionada com a vida-de-prateleira de produtos cárneos fatiados, há também dificuldades relacionadas com a inocuidade destes produtos. Um estudo de riscos realizado nos Estados Unidos indicou que os produtos cárneos fatiados, especialmente aqueles fatiados nos estabelecimentos de venda, são o alimento com maior risco de contaminação por *L. monocytogenes* (LUBER *et al.*, 2011).

O gênero *Listeria* é composto por microrganismos gram-positivos, não formadores de esporos, catalase positivos e produtores ácido láctico a partir de glicose e outros açúcares. As espécies mais conhecidas são: *L. grayi*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. ivanovii* (JAY *et al.*, 2005). Duas novas espécies, *L. marthii* e *L. rocourtiae* foram recentemente relatadas por Leclercq *et al.* (2009) e por Graves *et al.* (2010), respectivamente.

O gênero *Listeria* é vastamente distribuído na natureza e pode ser encontrado no solo, fezes de animais, vegetação e água, entre outros (JAY *et al.*, 2005).

De todas as espécies de *Listeria*, *Listeria monocytogenes* é a de maior importância para a microbiologia de alimentos por ser patogênica. O principal fator de virulência de *L. monocytogenes* é a listeriosina O, uma substância responsável pela lise de eritrócitos e destruição de células fagocíticas (Jay *et al.*, 2005).

O período de incubação da listeriose é de 1 a 7 dias, o que dificulta a identificação do alimento causador. Os principais sintomas são parecidos com os de uma gripe, podendo ocorrer dores abdominais e diarreia. A doença é mais séria em indivíduos imunodeprimidos, idosos, gestantes e recém-nascidos. Acredita-se que a dose requerida para causar a doença nesses indivíduos seja de 100-1000 células. Uma vez ingerida, *L. monocytogenes* pode invadir o epitélio gastro-intestinal e passar para a corrente sanguínea, podendo infectar órgãos do corpo normalmente estéreis como fígado, baço e sistema linfático. A *L. monocytogenes* pode atravessar a barreira da placenta e infectar o feto, levando a parto prematuro e aborto. A natureza invasiva da *L. monocytogenes* pode levar a condições fatais, como septicemia, encefalites e meningites (DREVETS e BRONZE, 2008 *apud* WARRINER e NAMVAR, 2009).

A listeriose é uma infecção relativamente rara em humanos, porém a taxa de letalidade de pessoas que desenvolvem a doença é muito alta, de 20 a 30% (WARRIER e NAMVAR, 2009; NEWELL *et al.* 2010; TODD e NOTERMANS, 2011).

A importância de *L. monocytogenes* para os alimentos é devida à sua capacidade de multiplicação em uma faixa ampla de temperatura, de 1 a 45°C, e de pH, de 4,1 a 9,6, podendo sobreviver nos alimentos por um longo período de tempo (Jay *et al.*, 2005). Warriner e Namvar (2009), Skandamis *et al.* (2008), Hequet *et al.* (2007), Mellefont e Roos (2007) e Murphy *et al.* (2005) incluem ainda como características essenciais para a *L. monocytogenes* se multiplicar nos alimentos o fato dela ser capaz de se desenvolver em concentrações superiores a 5% de sal, em temperatura de refrigeração e também na ausência de oxigênio, tornando produtos embalados a vácuo importantes veículos desse microrganismo. De acordo com Ivanek *et al.* (2004), as características microbiológicas desse patógeno fazem com que a sua total eliminação no alimento seja uma meta irrealista.

Rantsiou *et al.* (2011) ressaltam que a *L. monocytogenes* passou a chamar a atenção como um patógeno veiculado por alimentos quando a refrigeração se estabeleceu como um processo de conservação em toda a cadeia de alimentos, com o objetivo de prolongar a VDP de alimentos processados, mantendo o aspecto fresco desejado pelos consumidores.

Os principais alimentos envolvidos em surtos de listeriose são os produtos cárneos e frutos do mar prontos para consumo e os queijos pastosos, que é atribuído às suas características intrínsecas, como alto teor protéico, moderada

atividade de água e poucos microrganismos competidores (WARRINER e NAMVAR, 2009).

Segundo Keskinen *et al.* (2008), um fator que contribui para a contaminação de plantas processadoras de alimentos com *L. monocytogenes* é a capacidade de formar biofilmes. Mesmo em condições desfavoráveis, o microrganismo pode permanecer viável nas superfícies de equipamentos e contaminar alimentos que já passaram por um processamento térmico. Os autores relataram estudos que mostram que *L. monocytogenes* é capaz de se transferir rapidamente tanto da lâmina de fatiamento para o produto quanto do produto para a lâmina de fatiamento. Além disso, Foong e Dickson (2004) verificaram que, independente do sorotipo, as cepas de *L. monocytogenes* conseguem se fixar rapidamente a produtos cárneos prontos para consumo. Em uma recente revisão bibliográfica sobre a capacidade de adesão da *L. monocytogenes* nos equipamentos e ambientes na indústria de alimentos, Carpentier e Cefer (2011) concluíram que o controle total deste microrganismo nas plantas processadoras de alimentos prontos para o consumo é extremamente difícil, talvez até impossível. Também Angelidis e Koutsoumanis (2006) concluíram que, devido à dificuldade de eliminar completamente *L. monocytogenes* nas indústrias de alimentos, todo empenho deve ser empreendido no sentido de associar o maior número de obstáculos para inibir a multiplicação do patógeno durante o armazenamento do produto e minimizar os riscos no momento de consumo.

Murphy *et al.* (2005) apresentaram resultados do CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Estados Unidos) indicando que, em 2000, *L. monocytogenes* foi responsável por 28% das mortes relacionadas ao consumo de alimentos contaminados por bactérias. Warriner e Namvar (2009) relataram um surto de listeriose causado pelo consumo de produtos cárneos fatiados, ocorrido em 2008 no Canadá, com 53 casos confirmados, e 20 mortes.

Os Estados Unidos são o país que têm a legislação mais rígida para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo, exigindo ausência do microrganismo em 50 g de produto (JAY *et al.*, 2005). A legislação brasileira, através da Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 que regulamenta os padrões técnicos microbiológicos para alimentos, estabelece padrões para a *L. monocytogenes* em apenas alguns tipos de queijos, de média, alta e muito alta umidade, especificando a ausência do microrganismo em 25g do produto. Para

todos os demais produtos alimentícios não há limites pré-estabelecidos para esse microrganismo (BRASIL, 2001).

Gombas *et al.* (2003) observaram a presença de *L. monocytogenes* em produtos cárneos fatiados, observando ainda que a prevalência nos produtos cárneos fatiados nos estabelecimentos de venda (supermercados) era maior que em produtos cárneos fatiados pelas indústrias. Contudo, a concentração de *L. monocytogenes* nas amostras de produtos cárneos fatiados e embalados na indústria foi maior do que a encontrada nos produtos manipulados nos próprios estabelecimentos de venda. Esse resultado foi explicado pela maior vida de prateleira dos produtos cárneos fatiados pelas indústrias, permitindo que *L. monocytogenes*, quando presente, atingisse populações mais elevadas que as encontradas nos produtos fatiados com menor vida de prateleira.

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

Segundo Mellefont e Ross (2007), mesmo que tenham sido tomados todos os cuidados necessários e um sistema de Análise de Perigo e Ponto Crítico de Controle (APPCC) tenha sido eficientemente implantado nas plantas processadoras de uma indústria de alimentos, o risco de *L. monocytogenes* estar presente permanece. Após uma análise de trabalhos publicados sobre a prevalência desse microrganismo na Grécia, Estados Unidos, Itália e Nova Zelândia, os autores concluíram que *L. monocytogenes* pode estar presente em aproximadamente 1 a 5% dos produtos cárneos prontos para consumo.

Nuffer *et al.* (2007) avaliaram as características de desenvolvimento de cepas de *L. monocytogenes* e *L. welshimeri* em um produto tipo mortadela, fatiado e armazenado a 4 °C e 7°C, verificando grande variabilidade entre as cepas testadas, mesmo sendo todas provenientes de plantas processadoras de carne. Glass *et al.* (2007) verificaram a eficiência de benzoato, propionato e sorbato no controle de *L. monocytogenes* em presunto suíno e produtos de peru fatiados. Mataragas *et al.*

(2003) estudaram o efeito da atividade de bactérias lácticas contra *L. monocytogenes* em um produto suíno curado, cozido e fatiado embalado à vácuo ou atmosfera modificada a 4°C. Samelis *et al.* (2001) testaram a ação de ácidos orgânicos e seus sais como uma alternativa no controle de *L. monocytogenes* em mortadela fatiada embalada à vácuo e armazenada a 4°C. Murphy *et al.* (2005), com o intuito de fornecer uma alternativa simples e com baixo custo para redução da contaminação por *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo, avaliaram duas técnicas de pasteurização pós-processamento HTST (high temperature, short time): tratamento térmico das fatias de mortadela com vapor antes e após seu acondicionamento nas embalagens. Barmpalia *et al.* (2005) investigaram a atividade antilistéria de várias concentrações de diversos compostos considerados GRAS (Generally Recognized as Safe): lactato de sódio, diacetato de sódio e gluconato-delta-lactona, adicionados individualmente ou em combinações de dois a dois ou três a três, na formulação de uma mortadela suína, contaminada artificialmente pós fatiamento e armazenada a 4 e 10°C.

Martins e Germano (2010) pesquisaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em 130 amostras de presunto suíno cozido e 130 amostras de salame, fatiados e embalados a vácuo pelo próprio fabricante, comprados na cidade de São Paulo, encontrando *Listeria* spp e *L. monocytogenes* em 1,5% e 0,8% das amostras de presunto, respectivamente. Os autores atribuíram esta baixa ocorrência à eficiência do processamento térmico e adoção de boas práticas durante o fatiamento, após o cozimento. Nas amostras de salame, a incidência de *Listeria* spp e de *L. monocytogenes* foi mais alta, 24,6% e 6,2%, respectivamente. Considerando que estes produtos são processados e constituem ambientes desfavoráveis para a sobrevivência e multiplicação destas bactérias, os autores concluíram que a contaminação detectada era consequência do fatiamento pós-processamento. Os autores sugeriram que a maior ocorrência destas bactérias em salame fatiado do que no presunto fatiado poderia ser explicada pelo alto teor de gordura e a baixa umidade do salame, responsáveis pela formação de camada de gordura na lâmina de fatiamento, que protege as células de *L. monocytogenes* e facilita o espalhamento da contaminação. Segundo Vorst *et al.* (2006), em produtos com alta umidade e baixo teor de gordura, como peito de peru, a taxa de adesão desse microrganismo à máquina de fatiamento é menor, pois a umidade liberada durante o

processo de fatiamento pode ter o efeito de limpar a lâmina durante este procedimento.

Assim como observado por Bersot *et al.* (2008), Mellefont e Ross (2007) também alertaram para a possibilidade de *L. monocytogenes* atingir concentrações elevadas em alimentos cárneos refrigerados prontos para consumo, apesar da contaminação inicial ser normalmente baixa (por exemplo, 10 UFC/g). Segundo estes autores, o fato é ainda mais preocupante em produtos que serão consumidos sem um tratamento térmico prévio.

Apesar de inúmeros trabalhos evidenciarem os esforços de pesquisadores na busca de soluções para inibir o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em produtos cárneos fatiados, Luber *et al.* (2011) são de opinião que muita pesquisa é ainda necessária para aumentar o número e a variedade de opções tecnológicas para a prevenção e o controle de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo.

1.3. Bacteriocinas de bactérias lácticas

As bactérias lácticas são capazes de produzir uma série de substâncias antimicrobianas como ácido láctico, peróxido de hidrogênio, diacetil, e outros ácidos orgânicos. Além desses produtos finais resultantes do metabolismo, algumas cepas são também capazes de sintetizar compostos antimicrobianos de origem protéica, denominados bacteriocinas (DEEGAN *et al.* 2006, GALVEZ *et al.* 2008). De maneira sucinta, bacteriocinas são pequenos peptídeos catiônicos, termoestáveis, sintetizados nos ribossomos das bactérias e que possuem atividade antimicrobiana, não tendo atividade contra as bactérias que as produziram. As bacteriocinas variam consideravelmente em peso molecular, propriedades bioquímicas e espectro e mecanismo de ação (DE MARTINIS *et al.*, 2002; SOOMRO *et al.*, 2002; BROMBERG *et al.*, 2004; DEVLIGHERE *et al.*, 2004; DEEGAN *et al.*, 2006; DRIDER *et al.*, 2006; GÁLVEZ *et al.*, 2007; HENG *et al.* 2007, GALVEZ *et al.*, 2008).

Deegan *et al.* (2006), consideram difícil a classificação das bacteriocinas. Dada sua natureza heterogênea, ela passa por constante atualização conforme sua estrutura e seu modo de ação são melhor compreendidas. Diversas classificações foram propostas para as bacteriocinas, sendo a mais recente a proposta por Heng *et al.* (2007), resultante de uma adaptação da classificação de Cotter *et al.* (2005). Os autores agrupam as bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-positivas em

quatro classes, de acordo com a sua estrutura química e função biológica: Classe I: peptídeos lantibióticos (que possuem o aminoácido lantionina (Lan) em sua estrutura), subdivididos em três grupos: a - bacteriocinas com estrutura linear, b - bacteriocinas com estrutura globular, c - bacteriocinas formadas por mais de um componente; Classe II: peptídeos não modificados (não-lantibióticos e não cíclicos), de peso molecular inferior a 10 kDa, também subdivididos em três grupos: a - bacteriocinas ativos contra *L. monocytogenes*, b - bacteriocinas multi-componentes, que precisam de dois ou mais peptídeos para ser ativas, c - bacteriocinas variadas, de baixo peso molecular e que não se enquadram em a e b; Classe III: peptídeos de peso molecular superior a 10 kDa, subdivididos em dois grupos: a - peptídeos que agem causando lise celular, b - bacteriocinas de alto peso molecular que matam as células alvo por outros meios que não a lise celular; e Classe IV: proteínas cíclicas.

Um número significativo de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos produz compostos antimicrobianos, mas bactérias lácticas são especialmente atrativas para aplicação em alimentos, pois são tipicamente associadas à fermentação de alimentos, e reconhecidas como bactérias *food grade* (DE MARTINIS *et al.*, 2002; DEEGAN *et al.*, 2006).

Bacteriocinas de bactérias lácticas oferecem uma série de propriedades desejáveis que as tornam adequadas para o uso como conservantes de alimentos: (i) são produzidas por bactérias GRAS, (ii) não são ativas e não são tóxicas às células eucarióticas, (iii) são inativadas por enzimas digestivas, tendo pequena influência na microbiota intestinal, (iv) são normalmente tolerantes a ampla faixa de pH e temperatura, (v) podem ter amplo espectro de ação, inibindo tanto bactérias patogênicas quanto deteriorantes, (vi) têm ação bactericida, agindo sobre a membrana citoplasmática e (vii) seus determinantes genéticos estão normalmente codificados no plasmídeo, facilitando a manipulação genética (THOMAS *et al.* 2000 *apud*. GÁLVEZ *et al.* 2007).

A capacidade das bactérias lácticas produzirem bacteriocinas faz com que estas bactérias tenham um importante papel biológico. No entanto, a natureza precisa de como este papel é exercido tem sido tema de intensas pesquisas (DEEGAN *et al.* 2006). De maneira geral, as bacteriocinas apresentam efeito bactericida decorrente da lise celular, podendo também apresentar um efeito bacteriostático, impedindo a multiplicação celular (DALIÉ *et al.* 2010). Segundo

Devlighere *et al.* (2004), as bacteriocinas atuam na membrana citoplasmática de células sensíveis, dissipando a força próton motriz, através da formação de poros na bicamada lipídica.

O acúmulo, nos últimos anos, de estudos conduzidos sobre bacteriocinas indica que sua aplicação em alimentos pode trazer uma série de benefícios, tais como extensão da vida-de-prateleira, proteção extra durante condições de abuso de temperatura, diminuição do risco de transmissão de microrganismos patogênicos na cadeia de alimentos, redução da necessidade de aplicação de conservantes químicos e possibilidade de uso de tratamentos térmicos mais brandos (GÁLVEZ *et al.* 2007).

As bacteriocinas mais estudadas são nisina, pediocina e sakacina, produzidas por cepas de *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus sakei* respectivamente. A eficiência protetora de culturas bacteriogênicas foi estudada principalmente em carnes e em produtos lácteos (DEVLIGHERE *et al.*, 2004).

As bacteriocinas podem ser incorporadas aos alimentos de, pelo menos, três maneiras: usando um preparado de bacteriocinas purificado ou semi-purificado como um ingrediente no alimento; incorporando um ingrediente previamente fermentado com uma bactéria produtora de bacteriocinas; ou utilizando a cultura produtora de bacteriocinas diretamente no alimento como uma cultura *starter*. O uso de bacteriocinas purificadas nem sempre é atrativo para a indústria de alimentos, pois nesta forma ela deve ser rotulada como aditivo e requer aprovação legal para o seu uso. As duas últimas alternativas não requerem aprovação legal, tampouco precisam ser rotuladas e por isso são rotas mais atrativas de incorporação aos alimentos (DEEGAN *et al.* 2006).

Outros usos alternativos de bacteriocinas têm sido estudados, como a aplicação da pediocina comercial ALTA 2351 em filme celulósico para inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* em presunto (SANTIAGO-SILVA *et al.* 2009).

A nisina é a única bacteriocina comercial de aplicação em alimentos. Há outros produtos comerciais que contém bacteriocinas em sua composição, como DURAFRESH (antigo ALTA, Kerry Bio-Science), um xarope de milho fermentado que possui vários metabólitos de bactérias lácticas, entre eles pediocina. Segundo Cintas *et al.* (2001), a nisina exerce ação bacteriolítica, através da formação de poros na membrana celular resultando em perda de material citoplasmático. Porém Barmpalia *et al.* (2005) relatam que, apesar da nisina exercer um efeito bactericida

imediatamente, a sua efetividade é limitada quando aplicada isoladamente em alimentos, especialmente em períodos longos de armazenamento. A legislação brasileira (DINAL/MS Portaria nº6, 1990; DETEN/MS Portaria nº34/1992 e portaria nº29/1996) permite o uso de nisina na dose de 12,5 mg/kg em queijos fundidos, requeijões e queijos pasteurizados (BRASIL, 1996). A aplicação de uma solução de ácido fosfórico contendo 200 ppm de nisina na superfície de salsichas antes de serem embaladas foi permitida pela Divisão de Operações Industriais do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, pertencente ao Ministério da Agricultura e do Abastecimento, em 1998 (BRASIL, 1998).

Ao investigar novas aplicações para bacteriocinas em alimentos, muitas considerações devem ser avaliadas para determinar a sua funcionalidade. Um dos critérios mais significantes é a resistência ao tratamento térmico. O processo térmico é usado extensamente no processamento de alimentos e pode causar perda de atividade das bacteriocinas. As propriedades químicas dos alimentos, como pH e teor de gordura, também podem influenciar significativamente na escolha de determinada bacteriocina para um alimento específico (DEEGAN *et al.* 2006).

Vários autores ressaltam que os resultados obtidos em laboratório nem sempre são reproduzidos quando as bacteriocinas são aplicadas em alimentos. A atividade antimicrobiana verificada *in vitro* contra determinadas espécies de microrganismos não leva em conta a microbiota presente no produto onde estas bacteriocinas serão aplicadas, ignorando interações possíveis. Nos testes em laboratório, a possível ligação das bacteriocinas com componentes dos alimentos, a permanência das bacteriocinas adsorvidas à superfície das bactérias produtoras, o efeito do pH na liberação e na atividade das bacteriocinas, a atividade de proteases, são alguns fatores que nem sempre são considerados. Além disso, as bacteriocinas podem ser adversamente afetadas pelas condições de processamento e estocagem como pH e temperatura de processamento e armazenagem do produto. (DEVLIGHERE *et al.* , 2004; DE MARTINIS *et al.* , 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2008).

1.4 Aplicação de bacteriocinas em produtos cárneos

Diversos estudos sobre aplicação de bacteriocinas em produtos cárneos para inibir o desenvolvimento de *L. monocytogenes* são conhecidos. De Martinis e Franco (1998) obtiveram bons resultados de inibição em lingüiça frescal contendo a cepa *Lactobacillus sake* 2a, produtora de bacteriocinas. Posteriormente, Liserre *et al.* (2002) observaram que esta cepa foi capaz de inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* por 15 dias de armazenamento, sendo que esse resultado foi ainda melhor quando o produto foi embalado com atmosfera modificada ao invés de à vácuo.

Vermeiren *et al.* (2004) observaram que isolados de *L. sakei* produtores e não produtores de bacteriocina foram igualmente eficientes como culturas protetoras em presunto. Mataragas *et al.* (2003) observaram redução significativa na contagem de *L. monocytogenes* aplicando tanto uma cepa produtora de bacteriocina quanto a bacteriocina isoladamente na superfície de um produto suíno curado. Também Urso *et al.* (2006) observaram que um isolado de *L. sakei* produtor de bacteriocina (sakacina P), utilizado como cultura *starter* em lingüiça fermentada, foi capaz de se multiplicar e produzir bacteriocina nas condições de processo tendo reduzido a contagem total de bactérias e também de enterococos ao final do período de fermentação. Além do efeito protetor, a cepa foi capaz de produzir as alterações sensoriais desejáveis resultantes do processo de fermentação, obtendo nota sensorial maior que a cultura starter padrão.

Albano *et al.* (2009) relataram que *Pediococcus acidilactici* produtor de bacteriocina, adicionado à massa de Alheira (uma lingüiça suína fermentada e defumada, típica de Portugal) antes da etapa de embutimento, atuou como um organismo bioprotetor contra *Listeria innocua*.

Outros autores avaliaram o uso de bacteriocinas em combinação com outros agentes antimicrobianos no controle de *L. monocytogenes* em produtos cárneos. Maks *et al.* (2010) avaliaram o efeito do uso combinado de pediocina com lactato de sódio e diacetato de sódio na resistência térmica de *L. monocytogenes* em mortadela fatiada. O lactato de sódio e o diacetato de sódio foram adicionados à massa enquanto que a pediocina foi adicionada ao produto através de um banho de imersão das fatias em solução contendo diferentes concentrações da bacteriocina. Os autores verificaram que a pediocina, nas concentrações de 0 a 5000 UA, causou

uma redução no valor-D, enquanto que em concentrações mais altas (7500 e 10000 UA) um efeito protetor foi verificado, uma vez que o valor-D para *L. monocytogenes* nestas condições aumentou.

Face à limitada disponibilidade de dados sobre a viabilidade de utilização de bacteriocinas de bactérias lácticas como agentes inibidores da multiplicação de *L. monocytogenes* em mortadela fatiada, bem como da extensão da vida de prateleira deste produto, elaborou-se este projeto de pesquisa, cujo objetivo principal foi isolar novas bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas de mortadela, caracterizar essas bactérias e suas bacteriocinas e avaliar seu potencial de aplicação para controle de *L. monocytogenes* em mortadela fatiada e para extensão da vida-de-prateleira destes produtos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi estudar o potencial de aplicação de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas isoladas de mortadela na inibição da multiplicação de *Listeria monocytogenes* em mortadela fatiada, assim como o seu impacto nas bactérias lácticas deteriorantes desse produto, visando um possível aumento na sua vida-de-prateleira.

Como objetivos mais específicos, pretendeu-se:

- Isolar e identificar diferentes bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas a partir de mortadela.
- Caracterizar as bacteriocinas produzidas pelas cepas isoladas quanto à:
 1. Espectro de ação
 2. Estabilidade em diferentes pH
 3. Resistência ao NaCl e agentes químicos
 4. Estabilidade térmica
- Selecionar entre as bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas aquelas que atendem melhor as necessidades do projeto e determinar as condições ótimas de tempo e temperatura para produção de bacteriocinas.
- Selecionar uma das cepas e purificar parcialmente a bacteriocina produzida, utilizando extração ácida.
- Avaliar a atividade antimicrobiana da bacteriocina parcialmente purificada *in vitro*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana da bacteriocina parcialmente purificada em mortadela fatiada experimentalmente contaminada com *L. monocytogenes*.
- Avaliar o potencial de aplicação da bacteriocina parcialmente purificada no aumento da vida-de-prateleira de mortadela fatiada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas ativas contra *Listeria monocytogenes* Scott A a partir de mortadela fatiada

O fluxograma que descreve esta etapa do trabalho está apresentado na Figura 1.

Figura 1: Fluxograma de isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas a partir de mortadela fatiada

As bactérias lácticas (BAL) foram isoladas de amostras de mortadela fatiada adquiridas no comércio da cidade de São Paulo. As amostras pertenceram a diferentes marcas comerciais e compreenderam dois tipos: 1. fatiadas pelo próprio fabricante e 2. fatiadas no estabelecimento comercial.

Para o isolamento das BAL, alíquotas de 25 g das amostras de mortadela fatiada foram adicionadas a 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e homogeneizadas em um *Stomacher* (Seward Medical, Inglaterra) por 60 segundos. Em seguida, diluições decimais subsequentes foram preparadas em água peptonada 0,1% e 1 mL de cada diluição foi semeado por profundidade em meio de cultura ágar DE MAN, ROGOSA, SHARPE (MRS) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). Após a solidificação do meio, uma sobrecamada de 5-6 mL desse mesmo meio foi adicionada para garantir condições microaerófilas para o desenvolvimento das bactérias lácticas. As placas foram incubadas a 30°C por 48 h.

Para verificar atividade inibitória contra a cepa *Listeria monocytogenes* Scott A utilizou-se o método de camada tripla conforme Todorov e Dicks (2006). Após as 48 h de incubação, as placas que apresentaram até 50 colônias receberam uma sobrecamada de BHI (BRAIN HEART INFUSION, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) semi-sólido (caldo BHI acrescido de 0,75% de ágar (Difco, Detroit, Estados Unidos) contendo 10^5 - 10^6 células/mL de *L. monocytogenes*. Para o preparo da cultura de *L. monocytogenes* utilizada neste teste, a cultura, mantida armazenada a -70°C em caldo BHI contendo com 20% de glicerol, foi reativada em caldo BHI a 37°C por 24 h, por duas vezes.

Após incubação das placas de ágar MRS contendo a cultura de *L. monocytogenes* por 24 h a 37°C, as colônias que apresentaram halo de inibição contra *L. monocytogenes* foram transferidas para tubos com caldo MRS (Difco, Detroit, Estados Unidos) e submetidas à coloração de Gram e ao teste de produção de catalase. A morfologia das bactérias foi observada em microscópio Olympus CBA com objetiva 100x e ocular 10x. O teste de produção de catalase foi realizado misturando-se 50 µL da cultura com 50 µL de solução de peróxido de hidrogênio a 3% e observando-se a formação de bolhas. As colônias que apresentaram halo de inibição contra *L. monocytogenes* e foram Gram positivas e catalase negativas foram consideradas BAL potencialmente produtoras de bacteriocinas.

3.1.1. Verificação da atividade inibitória do sobrenadante: Teste de antagonismo *spot-on-the-lawn*

Para confirmação da produção de substâncias antagonísticas, as colônias de BAL potencialmente produtoras de bacteriocinas foram submetidas ao teste de antagonismo *spot-on-the-lawn*, conforme descrito em Lewus e Montville (1991) e Van Reenen *et al.* (1998) com modificações. Para isso, as colônias foram transferidas para tubos contendo caldo MRS e incubadas a 30°C por 24h. Uma alíquota de 1 mL dessas culturas foi coletada e centrifugada na Centrífuga 5417C (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 10.600 xg por 10 min.

Uma alíquota de 10 µL do sobrenadante livre de células foi transferida para a superfície de placas de Petri contendo uma camada de ágar-ágar e uma sobrecamada de BHI semi-sólido contendo 10^5 - 10^6 células/mL de *L. monocytogenes* Scott A. Após completa absorção da alíquota pelo meio de cultura, as placas foram incubadas a 37°C por 18-24h, observando-se a formação de halo de inibição ao redor das alíquotas.

3.1.2. Verificação da natureza protéica da substância responsável pela atividade inibitória do sobrenadante.

As BAL que apresentaram halo no teste de antagonismo *spot-on-the-lawn* foram submetidas ao teste de sensibilidade das substâncias antagonísticas produzidas à proteases, conforme descrito em De Martinis e Franco (1998).

Os sobrenadantes das culturas de BAL, obtidos conforme descrito anteriormente, foram tratados com as enzimas pepsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), α - quimiotripsina de pâncreas bovino tipo II (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) e Protease tipo XIV de *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), todas na concentração de 1,0 mg/mL.

Após a adição da enzima ao sobrenadante, os tubos foram mantidos a 37°C por 1 h e em seguida a 97°C por 3 min para inativação enzimática. As misturas foram resfriadas até a temperatura ambiente, e submetidas ao teste *spot-on-the-lawn*, conforme descrito anteriormente. Como controles, foram testados: 1. sobrenadantes sem tratamento enzimático mas aquecidos a 97°C por 3 min, 2.

sobrenadantes sem tratamento enzimático e sem aquecimento e, 3. água destilada estéril.

As culturas de BAL cujos sobrenadantes perderam atividade após o tratamento com as enzimas foram consideradas produtoras de bacteriocinas.

3.2. Caracterização das bacteriocinas presentes nos sobrenadantes das culturas de BAL

As bacteriocinas produzidas pelas BAL foram submetidas aos testes de caracterização apresentados na Figura 2.

Figura 2. Esquema dos testes de caracterização das bacteriocinas produzidas pelas BAL e da seleção do isolados produtores de bacteriocina.

3.2.1. Determinação da estabilidade das bacteriocinas em diferentes pH

A estabilidade das bacteriocinas presentes no sobrenadante de dezenove culturas em diferentes pH foi realizado conforme descrito em Albano *et al.* (2007). O pH do sobrenadante de cada cultura foi ajustado com HCl 1M (Synth, São Paulo, Brasil) ou NaOH 1M (Synth, São Paulo, Brasil) para 2, 4, 6, 8, 10 e 12, mantido nessas condições a 25°C por 1 h e em seguida corrigido para 4-6, com adição de HCl 1M ou NaOH 1M. Os sobrenadantes foram então testados quanto à atividade inibitória frente a *L. monocytogenes* Scott A, empregando-se o teste *spot-on-the-lawn* com diluição crítica, conforme Rosa *et al.* (2002). Para isso, os sobrenadantes foram diluídos em placas de microtitulação de 96 poços, nas proporções 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128 em água ultra-purificada (Milli-Q®, Millipore, Bredford, Estados Unidos), esterilizada. Em seguida, transferiu-se 10 µL de cada diluição para placas contendo a cultura de *L. monocytogenes* Scott A (10^5 - 10^6 células/mL), expressando-se o resultado em UA/mL (Unidades Arbitrárias por mililitro), correspondente à diluição máxima com formação de halo de inibição.

3.2.2. Determinação do espectro de ação das bacteriocinas

O espectro de atividade das bacteriocinas presentes nos sobrenadantes de dezenove culturas de BAL produtoras de bacteriocina foi determinado através do teste *spot-on-the-lawn*, conforme descrito anteriormente, empregando-se os micro-organismos listados na Tabela 1. O meio de cultura utilizado na sobrecamada, o microrganismo indicador (MRS, BHI ou TSA) (TSA – Agar Soja Triptona, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e a temperatura de incubação para cada teste também estão especificados na Tabela 1. O resultado foi expresso em cm, correspondente ao diâmetro do halo de inibição para cada microrganismo indicador, após 18h de incubação.

Tabela 1: Microrganismos e condições experimentais utilizados no teste de determinação do espectro de ação da bacteriocina.

Micro-organismo	meio	T(°C)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 1178	TSA	37
<i>Bacillus mycoides</i>	TSA	37
<i>Cronobacter sakazakii</i> CDC 996-77	TSA	37
<i>Cronobacter sakazakii</i> CFS 10	TSA	37
<i>Cronobacter sakazakii</i> CFS 101	TSA	37
<i>Cronobacter sakazakii</i> E 782	TSA	37
<i>Cronobacter sakazakii</i> SK90	TSA	37
<i>Enterococcus hirae</i> D105	TSA	37
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	TSA	37
<i>Enterococcus faecium</i> ET 05	TSA	37
<i>Enterococcus faecium</i> ET 12	TSA	37
<i>Enterococcus faecium</i> ET 88	TSA	37
<i>Enterococcus faecium</i> S100	TSA	37
<i>Enterococcus faecium</i> S154	TSA	37
<i>Enterococcus faecium</i> S5	TSA	37
<i>Enterococcus faecium</i> ST211	TSA	37
<i>Enterococcus faecium</i> ST62	TSA	37
<i>Enterococcus faecalis</i>	TSA	37
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	TSA	37
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	TSA	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 101	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 103	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 104	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 106	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 211	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 302	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 408	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 409	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 422	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 426	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 506	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 603	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 607	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 620	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 637	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 703	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 709	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 712	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 724	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	BHI	37
<i>Listeria seeligeri</i>	BHI	37
<i>Listeria welshimeri</i>	BHI	37
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ET 34	TSA	37
<i>Salmonella</i> Bradenburg H9812	TSA	37
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	TSA	37
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	TSA	37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	TSA	37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	TSA	37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	TSA	37

Continuação Tabela 1:

Micro-organismo	meio	T(°C)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA14	MRS	30
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La5	MRS	30
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Lac 4	MRS	30
<i>Lactobacillus curvatus</i> ET06	MRS	30
<i>Lactobacillus curvatus</i> ET30	MRS	30
<i>Lactobacillus curvatus</i> ET31	MRS	30
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> B5	MRS	30
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ET 32	MRS	30
<i>Lactobacillus fermentum</i> ET35	MRS	30
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS	30
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS	30
<i>Lactobacillus plantarum</i> V69	MRS	30
<i>Lactobacillus sakei</i> 2a	MRS	30
<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> B16	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> 704	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> B1	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> B15	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> B17	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> B2	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> D2	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> D3	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> D4	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> D5	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> MK02R	MRS	30

3.2.3. Determinação da estabilidade térmica das bacteriocinas

A partir dos resultados obtidos nos testes anteriores foram selecionadas 7 BAL para serem melhor caracterizadas. O sobrenadante da cultura das 7 BAL selecionadas foram submetidos ao teste de estabilidade térmica. O teste foi realizado conforme descrito em Albano *et al.* (2007), ou seja, 1 mL do sobrenadante de cada cultura de BAL foi transferido para um microtubo Eppendorf e mantido por 1 h e 2 h a 4°C, 25°C, 30°C, 37°C, 45°C, 60°C, 80°C e 100°C e por 15 min a 121°C. Para os ensaios a 4°C, 25°C, 30°C, 37°C, 45°C e 60°C, foram utilizadas estufas com controle de temperatura e para os ensaios a 80°C e 100°C, banhos térmicos. O ensaio a 121°C foi realizado em autoclave. Para avaliação da atividade da bacteriocina após o tratamento térmico, empregou-se o teste *spot-on-the-lawn*, conforme descrito em 3.1.1, com diluição crítica até 1:128.

3.2.4. Determinação da resistência das bacteriocinas ao NaCl e a agentes químicos

As sete BAL empregadas no teste de estabilidade térmica das bacteriocinas foram também testadas quanto à resistência das bacteriocinas a diferentes concentrações de NaCl e agentes químicos. Os testes foram realizados de acordo com Todorov e Dicks (2006). Para testar a resistência ao NaCl, 1 mL do sobrenadante de cada cultura de BAL foi transferido para um microtubo Eppendorf ao qual se adicionou NaCl de forma a atingir as concentrações de 1%, 2%, 3%, 4% e 5%. Os microtubos foram mantidos a 7 °C por 1 h, e em seguida, a atividade da bacteriocina foi determinada através do teste *spot-on-the-law*, conforme descrito anteriormente, com diluição crítica até 1:128.

Para testar a influencia de agentes químicos na atividade da bacteriocina, NaCl, 1 mL do sobrenadante de cada cultura de BAL foi transferido para um microtubo Eppendorf ao qual se adicionou Tween[®] 20 (Synth, São Paulo, Brasil), Tween[®] 80 (Synth, São Paulo, Brasil), uréia (Synth, São Paulo, Brasil) ou Triton X-100 (Synth, São Paulo, Brasil), de forma a atingir a concentração de 1% (p/v). Após 2 h a 30°C, os sobrenadantes tratados foram submetidos ao teste *spot-on-the-lawn* como já descrito anteriormente.

Em ambos os testes, foram incluídos controles da atividade inibitória de cada componente testado, sem a adição dos sobrenadantes das culturas de BAL em avaliação.

3.3. Identificação das bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas

Com base nos resultados de estabilidade das bacteriocinas em diferentes pH e de espectro de atividade, seis BAL foram selecionadas e submetidas a testes de identificação através do sequenciamento do gene 16S do rDNA. Não foi realizado o seqüenciamento de um dos isolados por problema na extração do DNA.

O DNA dos isolados foi extraído empregando-se o DNeasy Blood & Tissue DNA Extraction Kit (QIAGEN). A reação de PCR seguiu o protocolo de Felske *et al.* (1997) utilizando os primers universais 8f (5'-CAC GGA TCC AGA CTT TGA TYM TGG CTC AG-3') e 1512r (5'-GTG AAG CTT ACG GYT AGC TTG TTA CGA CTT-3') em que Y e M indicam C+T e A+C, respectivamente. A concentração do DNA no

extrato ($\mu\text{g/mL}$) foi determinada no espectrofotômetro Nano Drop 2000 (ThermoScientific, Wilmington, U.S.A.). Para cada 20 μL da reação de PCR foram utilizados: 1 μL de DNA (100 $\mu\text{g/mL}$); 6,8 μL Água ultra purificada, 2 μL de tampão rTaq Buffer 10x (New England Biolabs, Ipswich, Estados Unidos), 1,95 μL dNTP 2,5mM (Fermentas International Inc., Toronto, Canada), 0,1 μL de cada primer (10 pmol/mL), 8 μL MgCl_2 (5 mM) (Fermentas International Inc., Toronto, Canada) e 0,5 μL Taq (5 U/ μL) (New England Biolabs, Ipswich, Estados Unidos). A reação de amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf, Hamburgo Alemanha) com os seguintes parâmetros: 94°C por 5 min, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 10 s, 61°C por 20 s e 68°C por 2 min, e finalização por 7 min a 72°C. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%(p/v) em tampão Tris-Acetato-EDTA (tampão TAE) a 100V por 2 h. Os géis foram corados em tampão TAE contendo 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídio. Os fragmentos amplificados foram sequenciados pelo Setor de Sequenciamento de DNA, no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP.

As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com as sequências depositadas na base de dados GenBank DNA utilizando-se o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Para cada isolado e para cada primer utilizado (*forward* ou *reverse*) foi obtido um índice de similaridade da sequência pesquisada em relação àquela armazenada no banco de dados.

Considerando que os primers universais utilizados não permitiram a identificação adequada da BAL, que poderia ser *Lactobacillus curvatus* ou *Lactobacillus sakei*, foi necessário realizar reação de amplificação com primers específicos para estas duas espécies. Essa diferenciação entre as espécies foi realizada apenas para os 3 isolados selecionadas para determinação da melhor temperatura de multiplicação e de produção de bacteriocinas. As reações foram realizadas de acordo com Berthier e Ehrlich (1998) utilizando os pares de primers 16 S (3'-GCTGGATCACCTCCTTTC-5') e Lc (5'-TTGGTACTATTTAATTCTTAG-3') para *L. curvatus*, e 16 S (3'-GCTGGATCACCTCCTTTC-5') e Ls (5'-ATGAACTATTAAATTGGTAC-3') para *L. sakei*.

Nos testes para *L. sakei*, foram empregadas as seguintes condições: para cada 20 μL da reação de PCR foram utilizados 2 μL de DNA (100 $\mu\text{g/mL}$); 8,7 μL Água ultra purificada, 2 μL de tampão rTaq Buffer 10x, 2 μL dNTP 2,5mM, 0,6 μL

de cada primer (10 pmol/mL) (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos), 4 μ L $MgCl_2$ (5 mM) e 0,1 μ L Taq (5 U/ μ L). A reação de amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler ep Gradient S com os seguintes parâmetros: 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 36°C por 30 s e 72°C por 1 min e finalização a 72°C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%(p/v) em tampão TAE a 100V por 40 min. Os géis foram corados em tampão TAE contendo 0,5 μ g/ml de brometo de etídio.

Para os testes para *L. curvatus* foram empregadas as seguintes condições: para cada 20 μ L da reação de PCR foram utilizados 2 μ L de DNA (100 μ g/mL); 10,7 μ L Água ultra purificada, 2 μ L de tampão rTaq Buffer 10x, 2 μ L dNTP 2,5mM, 0,6 μ L de cada primer (10 pmol/mL) (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos), 2 μ L $MgCl_2$ (5 mM) e 0,1 μ L Taq (5 U/ μ L). A reação de amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler ep Gradient S com os seguintes parâmetros: 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 40°C por 30 s e 72°C por 1 min e finalização a 72°C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%(p/v) em tampão TAE a 100V por 40 min. Os géis foram corados em tampão TAE contendo 0,5 μ g/ml de brometo de etídio.

3.4. Seleção do isolado produtor de bacteriocinas e obtenção da bacteriocina semi purificada para aplicação na mortadela fatiada

3.4.1. Otimização da produção das bacteriocinas

Três BAL produtoras de bacteriocinas foram selecionadas para determinação da melhor temperatura de multiplicação e de produção de bacteriocinas (25°C, 30°C e 37°C).

Para determinação da melhor temperatura de multiplicação, cada uma das três BAL foi inoculada em caldo MRS numa concentração inicial de 10^2 UFC/mL, mensurando-se a densidade óptica cada 2 h, por 24 h, a um comprimento de onda de 600nm no espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra). A produção de bacteriocina em cada ponto de análise foi verificada através do teste *spot-on-the-lawn* já descrito anteriormente, com diluição crítica até 1:128.

3.4.2. Obtenção da bacteriocina parcialmente purificada para os testes *in situ*

Com base nos resultados obtidos na otimização da produção de bacteriocina, uma das três BAL, denominada RJC1, foi selecionada para obtenção da bacteriocina parcialmente purificada.

Visando obter um produto com menor quantidade de proteínas interferentes, a purificação foi realizada submetendo-se as células da RJC 1 a tratamento ácido conforme YANG *et al.*(1992) e ROSA *et al.* (2002). Desta forma, a bacteriocina foi obtida partindo-se de 4,5 L de caldo MRS inoculado com 1% de cultura a $10^7 - 10^8$ UFC/mL e incubado por 18 h a 30°C. Em seguida, o pH do caldo MRS foi corrigido para 6,0 com solução NaOH 10N. A cultura foi aquecida por 30 minutos a 80°C para inativação de proteases, e em seguida centrifugada na centrífuga RC5C (Sorvall Instruments, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Estados Unidos) por 15 min a 3000 xg a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com solução tampão 2- [N-morfolino]- etanosulfônico (MES) (Sigma, Estados Unidos) a 5 mmol/L, pH 6,5, empregando-se quantidade correspondente a 1/5 do volume inicial de MRS. As células foram suspensas em 400 mL de solução de NaCl 100mm/L com pH 2,0 ajustado com ácido fosfórico concentrado. A mistura foi mantida sob agitação a 4°C por 1 hora para que as bacteriocinas aderidas às células passassem para o meio. Em seguida, a mistura foi novamente centrifugada na centrífuga RC5C por 15 min a 3000 xg a 4°C, e o pH do sobrenadante foi corrigido para 6,0 com NaOH 1N. O sobrenadante foi então submetido à diálise no sistema Amicon (Millipore, Bedford, Estados Unidos) usando membrana com limite de exclusão de 1000 Da. O extrato concentrado foi esterilizado por filtração em membrana Millex GV 0,22 µm (Millipore, Bedford, Estados Unidos). A atividade da solução obtida contra *L. monocytogenes* Scott A foi verificada através do teste *spot-on-the-lawn* já descrito anteriormente, com diluição crítica até não se observar mais halo de inibição.

3.4.3. Determinação do peso molecular da bacteriocina parcialmente purificada

O peso molecular da bacteriocina produzida pelo isolado RJC 1 foi estimado por SDS-PAGE (eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida e SDS),

conforme protocolo adaptado de Schagger e Von Jagow (1987), empregando-se o marcador de baixo peso molecular Color marker ultra low range C6210 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) variando de 26.600 Da a 1.060 Da.

O gel obtido na SDS-PAGE foi dividido ao meio, sendo uma metade fixada com solução de formaldeído a 5% e a outra com uma solução contendo 20% isopropanol e 10% ácido acético, seguida de lavagem com água ultrapurificada esterilizada. A primeira metade foi corada com solução de Comassie Blue e a outra recebeu sobrecamada com meio BHI semi-sólido contendo 1% *L. monocytogenes* Scott A 10^8 UFC/g, conforme descrito em Todorov *et al.* (2010a). Após a incubação a 37°C por 18h, verificou-se o posicionamento do peptídeo com atividade antimicrobiana no gel. O peso molecular deste peptídeo (bacteriocina parcialmente purificada) foi estimado por comparação com as bandas presentes no gel corado com *comassie blue*.

3.5.Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da bacteriocina parcialmente purificada frente à *L. monocytogenes*

A atividade *in vitro* da bacteriocina parcialmente purificada foi avaliada frente a diferentes isolados de *L. monocytogenes*, testados individualmente e agrupados em um *pool* de 10 isolados. Os isolados de *L. monocytogenes* selecionados para este teste são originários de produtos cárneos cozidos (presunto e salsicha), e pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Para o teste, culturas de *L. monocytogenes* obtidas em caldo BHI por 18 h a 37°C foram lavadas duas vezes com água peptonada 0,1% (p/v) e a concentração padronizada em 10^8 UFC/mL, através da leitura da densidade óptica a 600nm no espectrofotômetro Ultrospec 2000. Em seguida, 10 µL de cada cultura foram adicionadas aos poços de uma placa de microtitulação contendo 200 µL de caldo BHI esterilizado e 5 µL da bacteriocina semi-purificada (204.800 UA/mL), resultando em atividade de 1.024 UA/poço. Quando testadas na forma de *pool*, foram misturadas porções iguais (1 mL) de cada cultura contendo 10^8 UFC/mL. As curvas de multiplicação foram elaboradas por 48 h, com leituras a cada 30 min a 37°C. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 595 nm, empregando-se o

espectrofotômetro leitor de microplacas Multiskan FC (ThermoScientific, Wilmington, EUA).

Os testes foram realizados em duplicatas, empregando-se como controles culturas de *L. monocytogenes* em caldo BHI não adicionado de bacteriocina.

Após este teste de triagem, um novo *pool* de *L. monocytogenes* foi estabelecido para se determinar a concentração de bacteriocina a ser utilizada nos experimentos *in situ*. Para isso, foram testadas quatro concentrações iniciais do inóculo (*pool* de 10 isolados de *L. monocytogenes*): 10^6 , 10^4 , 10^2 e 10 UFC/mL. Para cada concentração inicial de inóculo, três concentrações da bacteriocina parcialmente purificada foram avaliadas, adicionando-se 3, 5 e 10 μ L da solução (204.800 UA/mL) por poço, de forma a atingir 3.000, 5.120 e 10.241 UA/mL de atividade, respectivamente. As curvas de multiplicação foram elaboradas por 48 h, com leituras a cada 30 min a 37°C. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 595 nm, empregando-se o espectrofotômetro leitor de microplacas Multiskan FC. Cada teste foi realizado em quadruplicata, empregando-se como controle negativo a mistura não adicionada da bacteriocina.

3.6. Avaliação da atividade antimicrobiana *in situ* da bacteriocina parcialmente purificada em mortadela fatiada experimentalmente contaminada

A avaliação da atividade antimicrobiana *in situ* da bacteriocina parcialmente purificada em mortadela fatiada experimentalmente contaminada foi realizada em duas etapas.

A primeira etapa objetivou determinar a melhor concentração de bacteriocina a ser utilizada nos testes, empregando-se *L. monocytogenes* com um nível de inoculação elevado (10^8 UFC/mL) para possibilitar a enumeração laboratorial. Neste experimento, trabalhou-se com mortadela adquirida no comércio já fatiada pelo fabricante, embalada a vácuo, que foi experimentalmente contaminada com o mesmo *pool* de isolados de *L. monocytogenes* utilizado para realização do teste *in vitro* descritos no item 3.5.

Para a contaminação experimental das fatias de mortadela seguiu-se o método SLIC™ (Sprayed Lethality In Container), adaptado de Luchansky *et al.* (2005) e Port-Fett *et al.* (2010), segundo o qual a embalagem a vácuo garante a distribuição

uniforme do inóculo em toda a superfície das fatias. As fatias de mortadela, de aproximadamente 17g cada, foram removidas da embalagem original e posicionadas individualmente dentro de sacos plásticos, transferindo-se 170 μL de inóculo contendo 10^8 UFC/mL para o centro de cada fatia, de forma a atingir uma concentração inicial de 10^6 UFC/g. Em seguida, adicionou-se ao mesmo ponto central da fatia 250, 450 ou 850 μL da bacteriocina parcialmente purificada, de forma a atingir as mesmas concentrações utilizadas nos testes *in vitro*, ou seja, 3.000, 5.120 e 10.241 UA/g. Foram também preparados controles contendo somente o inóculo, sem adição de bacteriocina. Os sacos plásticos contendo as fatias de mortadela foram fechados, selados a vácuo (Seladora AP 500, TecMaq, Brasil) e armazenados a 37°C por 2 dias. A enumeração de *L. monocytogenes* nas fatias foi realizada nos dias 0, 1 e 2.

A enumeração de *L. monocytogenes* foi feita homogeneizando-se cada fatia com água peptonada 0,1% p/v, na proporção de 1:10, empregando-se um *Stomacher* (Seward Medical, Inglaterra) por 30 segundos. Esta mistura foi submetida à diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% p/v, e uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi transferida para duas placas de petri vazias, adicionando-se 10 mL de ágar soja triptona (TSA) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) acrescido de 0,6% de extrato de levedura (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) (TSAYE). Após homogeneização e solidificação do meio de cultura, adicionou-se 5 mL de meio ágar seletivo listeria, formulação Oxford (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), conforme Kang e Fung (1999). As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e em seguida determinou-se o número de UFC por grama de mortadela.

A segunda etapa correspondeu aos testes de avaliação do potencial tecnológico da bacteriocina parcialmente purificada na extensão da vida de prateleira e no controle de *L. monocytogenes* em mortadela fatiada durante armazenamento sob refrigeração. Como parâmetro indicador da vida de prateleira, empregou-se a contagem de bactérias lácticas.

De acordo com os resultados obtidos na primeira etapa, verificou-se que a melhor concentração de bacteriocina a ser utilizada no experimento final era 3.000 UA/g, correspondente a 250 μL da bacteriocina parcialmente purificada por fatia de mortadela. As fatias de mortadela foram experimentalmente contaminadas com o *pool* de *L. monocytogenes* na concentração de 10^2 - 10^3 UFC/g, tentando simular uma contaminação real, e que ao mesmo tempo permitisse a quantificação em

laboratório. O preparo do *pool* de bactérias, a adição do inóculo e da bacteriocina parcialmente purificada e a embalagem das fatias de mortadela experimentalmente contaminadas foram feitos utilizando o mesmo procedimento do experimento anterior. As condições avaliadas nesse experimento foram:

- I. sem inóculo, sem bacteriocina (controle);
- II. apenas adição da bacteriocina parcialmente purificada;
- III. apenas adição do inóculo;
- IV. adição do inóculo e da bacteriocina parcialmente purificada.

As fatias de mortadela experimentalmente contaminadas com o *pool* de *L. monocytogenes* foram armazenadas em refrigeração a 7°C até que apresentassem sinais visíveis de deterioração. Os experimentos foram repetidos três vezes e cada enumeração foi realizada em duplicata.

A enumeração de *L. monocytogenes* foi feita conforme já descrito anteriormente, ou seja, cada fatia de mortadela foi homogeneizada com água peptonada 0,1% p/v, na proporção de 1:10, empregando-se um *Stomacher* (Seward Medical, Inglaterra) por 30 segundos. Esta mistura foi submetida a diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% p/v, e uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi transferida para duas placas de petri vazias, adicionando-se 10 mL de ágar TSA acrescido de 0,6% de extrato de levedura (TSAYE). Após homogeneização e solidificação do meio de cultura, adicionou-se 5 mL de meio ágar seletivo listeria, formulação Oxford, conforme Kang e Fung (1999). As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e em seguida determinou-se o número de UFC por grama de mortadela.

Para a enumeração de bactérias lácticas, transferiu-se 1 mL de cada diluição para uma placa de petri vazia e adicionou-se 15 mL de ágar MRS. Após homogeneização e solidificação do meio, adicionou-se 5 mL de ágar MRS para formar uma sobre camada. As placas foram incubadas a 30°C por 48 h e as colônias típicas foram contadas. As placas foram preparadas em duplicatas de cada diluição.

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA – Experimento inteiramente casualizado) e ao teste de médias de Tukey para verificar a significância das diferenças entre os resultados obtidos, tanto em relação aos diferentes tratamentos para um mesmo dia, quanto em relação a um mesmo tratamento em diferentes dias. Utilizou-se o software Statística 7.0 (Statsoft Inc., USA), adotando-se um grau de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas ativas contra *Listeria monocytogenes* Scott A a partir de mortadela fatiada

Dentre as bactérias lácticas isoladas, 19 apresentaram atividade antimicrobiana devido a alguma substância de natureza protéica presente no sobrenadante e foram, portanto, consideradas produtoras de bacteriocina. Esses isolados foram provenientes de 7 amostras de mortadelas diferentes.

A tabela 2 apresenta a origem dos isolados de BAL produtoras de bacteriocina e características das amostras de mortadela de onde foram isoladas. Os isolados 1, 2, 3, e 14, 15, apesar de serem provenientes de produtos do mesmo fabricante, estão agrupados separadamente, pois foram adquiridos em dias diferentes e são de lotes diferentes.

Tabela 2: Origem dos isolados de BAL produtores de bacteriocina e características das amostras de mortadela

Isolado	Amostra	Característica fatiamento
1	Mortadela A embalada à vácuo	próprio fabricante
2		
3		
4	Mortadela B	estabelecimento comercial
5	Mortadela C	estabelecimento comercial
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13	Mortadela D	estabelecimento comercial
14	Mortadela A embalada à vácuo	pelo próprio fabricante
15		
16	Mortadela E embalada à vácuo	pelo próprio fabricante
17		
18	Mortadela F	estabelecimento comercial
19		

4.2. Caracterização das bacteriocinas presentes nos sobrenadantes das culturas de BAL

4.2.1. Determinação da estabilidade das bacteriocinas em diferentes pH

Os resultados de atividade dos sobrenadantes das culturas de BAL após 1h em pH 2 a 10 estão apresentados na Tabela 3. Conforme pode ser observado, o efeito do pH na atividade dos sobrenadantes variou de acordo com o isolado testado. Somente dois dos 19 isolados testados (isolados 1 e 4) mantiveram a atividade antimicrobiana em todos os pH testados. Todos os demais isolados perderam atividade em pH 10. Os isolados 8 e 11 foram os mais sensíveis à variação do pH. A tabela 3 indica também que o isolado 3 foi o que apresentou pior atividade contra a cepa *L. monocytogenes* Scott A em todos os pH avaliados.

Tabela 3: Efeito do pH na atividade antimicrobiana (UA/mL) dos sobrenadantes livres de células dos isolados de BAL produtores de bacteriocina

pH	Isolado BAL									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	12.800	12.800	200	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800
4	12.800	12.800	3.200	12.800	12.800	12.800	12.800	1.600	12.800	12.800
6	12.800	12.800	400	12.800	12.800	12.800	12.800	6.400	12.800	12.800
8	12.800	800	400	12.800	0	12.800	1.600	0	12.800	200
10	12.800	0	400	12.800	200	0	3.200	200	0	6.400

pH	Isolado BAL								
	11	12	13	14	15	16	17	18	19
2	6.400	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	6.400
4	1.600	12.800	12.800	12.800	6.400	12.800	12.800	12.800	12.800
6	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800
8	0	12.800	3.200	3.200	12.800	12.800	12.800	3.200	1.600
10	200	400	0	6.400	0	200	0	0	0

Tais alterações na atividade da bacteriocina de acordo com o pH do meio podem ser atribuídas à mudanças na sua estrutura molecular, que podem modificar a sua solubilidade no meio, ou mesmo interferir no mecanismo de ação sobre as células do micro-organismo indicador.

Estes resultados de variabilidade de acordo com a bacteriocina testada estão de acordo com outros trabalhos que avaliaram a estabilidade de diferentes bacteriocinas a alterações de pH. Jack *et al.* (1996) observaram a perda de atividade da bacteriocina piscicolina 126, produzida por uma cepa de *Carnobacterium piscicola* após 10 minutos em pH acima de 6. Xiraphi *et al.* (2008) também verificaram a perda de atividade antimicrobiana de uma bacteriocina produzida por *Leuconostoc mesenteroides* a partir de pH 6,0. Albano *et al.* (2007), constataram que a bacteriocina produzida por *Pediococcus acidilactici* perdeu 50, 75 e 100% da atividade nos pH 8, 10 e 12, respectivamente e 25 e 50% nos pH 4 e 2, respectivamente. Entretanto, alguns autores relatam que algumas bacteriocinas são estáveis mesmo em pH elevado. Todorov *et al.* (2005) e Todorov *et al.* (2010b) observaram que as bacteriocinas produzidas por *Pediococcus pentosaceus* e por *Enterococcus faecium*, respectivamente, mantiveram sua atividade na faixa de pH de 2 a 12.

4.2.2. Determinação do espectro de ação das bacteriocinas

A maioria dos sobrenadantes contendo bacteriocinas produzidas pelos 19 isolados de BAL inibiu todas as cepas testadas de *L. monocytogenes*, com exceção da cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Tabelas 4 e 5). Verificou-se que os isolados 17 e 18 não inibiram também a cepa *L. monocytogenes* 101. Por outro lado, nenhum dos sobrenadantes foi ativo contra as bactérias gram-negativas testadas (*Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* O157:H7 35150, *Salmonella* Bradenburg H9812, *Samonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076). Os isolados 1 e 2 foram ativas contra o maior número de bactérias: 29 das 74 testadas, enquanto o isolado 17 foi o menos ativo, inibindo apenas 22 linhagens.

De maneira geral, bacteriocinas de BAL não inibem gêneros de bactérias gram-negativas, embora alguns autores já tenham reportado bacteriocinas com ação inibitória sobre algumas bactérias gram-negativas (TODOROV e DICKS, 2006; TODOROV *et al.* 2010a; TODOROV *et al.* 2010b). De acordo com Castro *et al.* (2011), a camada lipopolissacarídica da parede celular das bactérias Gram negativas impede o acesso das bacteriocinas ao sítio ativo na membrana celular bacteriana.

Tabela 4: Diâmetro do halo de inibição (cm) no teste *spot-on-the-lawn* para cada sobrenadante de BAL contendo bacteriocinas, de acordo com o micro-organismo indicador testado.

Micro-organismo	Isolado BAL																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 1178	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Bacillus mycoides</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cronobacter sakazakii</i> CDC 996-77	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cronobacter sakazakii</i> CFS 10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cronobacter sakazakii</i> CFS 101	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cronobacter sakazakii</i> E 782	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cronobacter sakazakii</i> SK90	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Enterococcus faecium</i> ET 05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Enterococcus faecium</i> ET 12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Enterococcus faecium</i> ET 88	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Enterococcus faecium</i> S100	1,1	1,0	0,0	1,0	1,0	1,4	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
<i>Enterococcus faecium</i> S154	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,8	0,8	1,0	1,0	0,0	0,8	0,0
<i>Enterococcus faecium</i> S5	1,0	1,1	1,3	1,3	1,2	1,1	1,3	1,3	1,2	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
<i>Enterococcus faecium</i> ST211	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Enterococcus faecium</i> ST62	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,0	1,0	1,2	1,1	1,0	1,1	1,1	1,2	1,4	0,0	1,5	1,4	1,3	1,5	1,4	1,4	0,0	1,3	1,1
<i>Enterococcus hirae</i>	1,3	1,3	1,3	1,1	1,0	1,0	1,3	1,3	1,2	1,2	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,2	1,0	1,2	1,2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Listeria monocytogenes</i> 101	2,1	2,0	2,0	1,8	2,0	2,1	1,8	2,2	2,3	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0,0	0,0	1,8
<i>Listeria monocytogenes</i> 103	1,5	1,6	1,5	1,4	1,5	1,5	1,2	1,5	1,4	1,5	1,5	1,5	1,4	1,2	1,6	1,5	1,4	1,5	1,4
<i>Listeria monocytogenes</i> 104	1,6	1,6	1,5	1,6	1,7	1,5	1,5	1,8	1,5	1,5	1,5	1,6	1,4	1,6	1,5	1,5	1,4	1,3	1,4
<i>Listeria monocytogenes</i> 106	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,5	1,6	1,4	1,5	1,7	1,1	1,4	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5
<i>Listeria monocytogenes</i> 211	1,9	1,8	1,9	1,7	1,6	1,7	1,7	2,0	2,1	2,0	2,1	2,0	2,0	1,6	1,6	1,5	1,6	1,7	1,6

Micro-organismo	Isolado BAL																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA14	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0	0,7
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Lac 4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactobacillus curvatus</i> ET06	1,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0	0,
<i>Lactobacillus curvatus</i> ET30	0,9	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactobacillus curvatus</i> ET31	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> B5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ET 32	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactobacillus fermentum</i> ET35	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> V69	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactobacillus sakei</i> 2a	1,1	1,2	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,1	1,1	1,0	1,0	1,0
<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactobacillus</i> sp.	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	0,6	0,5	0,0	0,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,7	0,0	1,0
<i>Lactococcus lactis</i> B16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactococcus lactis</i> 704	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactococcus lactis</i> B1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactococcus lactis</i> B15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactococcus lactis</i> B17	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactococcus lactis</i> B2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactococcus lactis</i> D2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactococcus lactis</i> D3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactococcus lactis</i> D4	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,7	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	0,0	1,0	0,0
<i>Lactococcus lactis</i> D5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lactococcus lactis</i> MK02R	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 5: Número de micro-organismos inibidos pelos 19 isolados de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas, em um total de 74 micro-organismos testados.

	Isolado BAL																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Nº de bactérias que o isolado inibiu	29	29	28	28	28	28	28	28	27	25	28	28	28	27	26	28	22	26	25
Nº de bactérias que o isolado não inibiu	45	45	46	46	46	46	46	46	47	49	46	46	46	47	48	46	52	48	49
Nº de <i>L. monocytogenes</i> que o isolado inibiu	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	19	19
Nº de BAL que o isolado inibiu	5	5	5	4	4	4	4	4	3	3	4	4	4	4	4	5	2	4	3

Os isolados cujas colunas estão pintadas de cinzas são os que foram selecionados para as próximas etapas do trabalho.

Com base no espectro de ação e na estabilidade em diferentes valores de pH, foram selecionados 7 isolados produtores de bacteriocinas para os testes subsequentes. O critério de seleção foi:

- Entre os isolados 1, 2 e 3, obtidos da mesma amostra de mortadela A fatiada pelo fabricante, foi selecionado o isolado 1 por apresentar melhor estabilidade aos pH testados.
- Entre os isolados da amostra mortadela C fatiada pelo estabelecimento comercial (isolados 5 a 12), selecionou-se o isolado 12 pois embora tenha apresentado espectro de ação semelhante aos isolados 5, 6, 7, 8 e 11, apresentou melhor estabilidade ao pH.
- Os isolados 14 e 15, obtidos da mortadela A fatiada pelo fabricante, apresentaram resultados similares quanto ao espectro de ação, mas o isolado 14 foi selecionado por ser mais estável na faixa de pH 4 a 6.
- Entre os isolados 16 e 17, provenientes da mortadela E fatiada pelo fabricante, selecionou-se o isolado 16 por inibir maior número de bactérias testadas.
- Entre os isolados 18 e 19, provenientes da mortadela F fatiada no estabelecimento comercial, selecionou-se o isolado 18 por inibir maior numero de bactérias testadas.

- Os isolados 4 e 13, obtidos das mortadelas B e D fatiadas nos respectivos estabelecimentos comerciais, foram selecionados por terem sido os únicos obtidos de uma única amostra.

4.2.3. Determinação da estabilidade térmica da bacteriocina

Conforme indicado na Tabela 6, as bacteriocinas, presentes no sobrenadante, produzidas pelos isolados 4, 12 e 16 são as mais termoestáveis, visto que mantiveram a atividade antimicrobiana após todos as combinações de tempo e temperatura testados, suportando inclusive a autoclavação a 121°C por 15min. A atividade dos sobrenadantes dos 7 isolados de BAL produtores de bacteriocinas foi a mesma após 1 e 2h a 4°C, 25°C, 30°C, 37°C, 45°C e 60°C, mas alguns isolados perderam atividade em temperaturas superiores. O isolado 13 perdeu parte de sua atividade após 2h a 80°C, e a combinação 100°C/1h e 100°C/2h reduziu também a atividade do sobrenadante dos isolados 1 e 14.

Tabela 6: Efeito da temperatura na atividade antimicrobiana (UA/mL) dos sobrenadantes livres de células dos isolados de BAL produtores de bacteriocina

Isolado	4°C		25°C		30°C		37°C		45°C		60°C		80°C		100°C		121°C
	1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h	15 min
1	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	6.400	6.400	6.400
4	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800
12	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800
13	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	6.400	12.800	6.400	6.400
14	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	6.400	6.400	6.400
16	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800
18	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800	6.400

Outros autores conseguiram resultados semelhantes em relação ao efeito da temperatura na atividade de bacteriocinas de bactérias lácticas (JACK *et al.*, 1996, TODOROV *et al.*, 2005, ALBANO *et al.*, 2007, XIRAPHI *et al.*, 2008, TODOROV *et al.*, 2010b). As bacteriocinas são pequenos peptídeos e por isso a sua alta estabilidade térmica.

Essas variações na atividade das bacteriocinas não impactam na sua aplicação final em relação a este projeto, pois o produto já terá passado pelas

etapas de tratamento térmico, sendo aplicada apenas no pós-processamento e armazenada sob refrigeração em seguida. Nesse caso, portanto é importante que mantenha as suas propriedades antimicrobianas em temperaturas de refrigeração, a 4°C como foi também avaliado.

4.2.4. Determinação da resistência ao sal e a agentes químicos

Todas as bacteriocinas presentes nos sobrenadantes produzidas pelos isolados selecionados se mostraram estáveis nas diferentes concentrações de NaCl testadas, na temperatura de 7°C por 1h (Tabela 7). Não foi observada inibição do micro-organismo indicador em nenhum dos testes controle (C7°C), garantindo que a inibição ocorreu devido à ação das bacteriocinas.

Tabela 7: Efeito de diferentes concentrações de NaCl na atividade antimicrobiana (UA/mL) sobrenadantes livres de células dos isolados de BAL produtores de bacteriocina, a 7°C.

Isolado	0%			1%		2%		3%		4%		5%	
	7°C	7°C	C 7°C	7°C	C 7°C	7°C	C 7°C	7°C	C 7°C	7°C	C 7°C	7°C	C 7°C
1	12.800	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0
4	12.800	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0
12	12.800	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0
13	12.800	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0
14	12.800	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0
16	12.800	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0
18	12.800	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0	12.800	0

A ausência de efeito do NaCl em temperatura de refrigeração (7°C) sobre a atividade antimicrobiana das bacteriocinas é um resultado importante pois produtos cárneos embutidos podem conter elevada concentração de sal, responsável pela retenção de líquido, que determina a suculência e maciez destes produtos. No caso de mortadelas, a concentração de sal não ultrapassa a 3%, portanto não há comprometimento da atividade das bacteriocinas presentes nestes produtos.

O efeito de uréia, Tween[®] 20, Tween[®] 80 e Triton X-100 na atividade antimicrobiana dos sobrenadantes pode ser visto na Tabela 8, que indica que, de maneira geral, a atividade dos sobrenadantes não foi afetada por estes componentes. Apenas os sobrenadantes dos isolados 13 e 16 perderam 50% de sua

atividade depois de tratados com Tween® 20 e Triton X-100, e Tween® 20, respectivamente.

Tabela 8: Efeito de diferentes compostos químicos na atividade antimicrobiana (UA/mL) sobrenadantes livres de células dos isolados de BAL produtores de bacteriocina

Isolado	Controle	Ureia	Tween 20	Tween 80	Triton X 100
1	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800
4	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800
12	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800
13	12.800	12.800	6.400	12.800	6.400
14	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800
16	12.800	12.800	6.400	12.800	12.800
18	12.800	12.800	12.800	12.800	12.800

4.3. Identificação das bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas

Os resultados obtidos do seqüenciamento do gene 16S dos 6 isolados, identificados como RJC 1, RJC 4, RJC 13, RJC 14, RJC 16 e RJC 18, estão apresentados na Tabela 9. Conforme pode ser visto nesta tabela, a porcentagem de similaridade destes isolados com as espécies *L. curvatus*, *L. sakei* e *L. graminis* foi elevada, inviabilizando a identificação precisa dos isolados. Castro *et al.* (2011) também obtiveram 100% de similaridade para as espécies *L. curvatus* e *L. sakei* após análise de sequência do gene 16S de um isolado produtor de bacteriocina no banco de dados GenBank e relatam que a dificuldade em se diferenciar essas duas espécies é comum. O mesmo foi constatado por Vermeiren *et al.* (2004) e por Hequet *et al.* (2007) em relação às espécies *L. curvatus* e *L. sakei*. Devido a esta dificuldade, Hequet *et al.* (2007) optaram por um PCR multiplex para distinguir as duas espécies, conforme descrito em Lee *et al.* (2004).

Tabela 9: Identificação dos isolados de BAL produtores de bacteriocinas por seqüenciamento do gene 16s, segundo GenBank.

Isolado	Identificação	% similaridade
RJC 1	<i>L. curvatus</i> , <i>L. sakei</i> ou <i>L. graminis</i>	99
RJC 4	<i>L. sakei</i> ou <i>L. curvatus</i>	99
RJC 13	<i>L. curvatus</i> , <i>L. sakei</i> ou <i>L. graminis</i>	100
RJC 14	<i>L. curvatus</i> , <i>L. sakei</i> ou <i>L. graminis</i>	98
RJC 16	<i>L. curvatus</i> , <i>L. sakei</i> ou <i>L. graminis</i>	100
RJC 18	<i>L. curvatus</i> , <i>L. sakei</i> ou <i>L. graminis</i>	99

Assim, os isolados 1, 4 e 16, selecionados aleatoriamente para a continuidade dos estudos com base nos resultados em relação ao efeito do sal e dos agentes químicos em sua atividade, foram submetidos reações de PCR em que foram utilizados *primers* específicos para a espécie *L. sakei* e *L. curvatus*. De acordo com as bandas obtidas no gel de eletroforese corado com brometo de etídio foi possível identificar os 3 isolados como *L. curvatus* (Figuras 3 e 4). Os produtos de PCR gerados pelos *primers* específicos para *L. sakei* não geraram nenhuma banda no gel de eletroforese igual ao controle positivo (Figura 3), o que permitiu concluir que não se tratava de *L. sakei*. Por outro lado, os produtos de PCR gerados pelos *primers* específicos para *L. curvatus* geraram bandas idênticas ao controle positivo (Figura 4), indicando que os três isolados pertencem a esta espécie, não sendo portanto necessário realização de PCR com *primer* específico para *L. graminis*.

Figura 3: Gel corado com brometo de etídio, após eletroforese dos produtos de PCR quando utilizado primer específico para a espécie *L. sakei*. CP: controle positivo; CN: controle negativo

Figura 4: Gel corado com brometo de etídio, após eletroforese dos produtos de PCR quando utilizado primer específico para a espécie *L. curvatus*. CP: controle positivo; CN: controle negativo

4.4. Seleção do isolado produtor de bacteriocinas e obtenção da bacteriocina semi purificada para aplicação na mortadela fatiada

Para a seleção do isolado produtor de bacteriocina a ser aplicada na mortadela, foi necessário verificar quais as melhores condições de produção de bacteriocina pelos três isolados selecionados, e assim otimizar a produção.

4.4.1. Otimização da produção das bacteriocinas

Os 3 isolados selecionados multiplicaram-se de forma semelhante, independentemente da temperatura (25°C, 30°C e 37°C), observando-se que a multiplicação foi mais lenta à 25°C que a 37°C (Figuras 5 e 6). A produção de bacteriocina acompanhou a multiplicação das bactérias, verificando-se para os 3

isolados que o máximo de produção foi atingido em 10 h a 25°C, em 8h a 30°C e em 6h a 37°C.

Figura 05: Multiplicação (curvas à esquerda) e produção de bacteriocina (barras à direita) pelos isolados de BAL (1, 4 e 16), de acordo com a temperatura (25°C, 30°C e 37°C). Cada ponto representa a media de três repetições.

Figura 06: Multiplicação (curvas à esquerda) e produção de bacteriocina (barras à direita) a 25°C, 30°C e 37°C, de acordo com o isolado de BAL. Cada ponto representa a media de três repetições.

Com base nos resultados apresentados nas Figuras 5 e 6, selecionou-se o isolado 1, identificado como *L. curvatus* e denominado RJC1, para extração da bacteriocina produzida e posterior aplicação na mortadela. A seleção foi baseada na constatação de uma produção de bacteriocina à 30°C ligeiramente melhor que os demais isolados (Figura 5).

Outros autores também utilizaram cepas de *L. curvatus* produtoras de bacteriocina como culturas bioprotetoras em produtos cárneos. Dicks *et al.* (2004) obtiveram resultados positivos na inibição de *L. monocytogenes* em salame elaborado com carne de avestruz aplicando a cepa *L. curvatus* DF126 produtora da bacteriocina curvacina DF126 como uma cultura *starter*. Benkerroum *et al.* (2005)

também utilizaram uma cepa de *L. curvatus* produtora de bacteriocina como cultura *starter* na fabricação de salame e obtiveram resultados positivos na inibição de *L. monocytogenes*. Kouakou *et al.* (2009) verificaram o potencial da cepa *L. curvatus* CWBI-B28 produtora de bacteriocina em inibir *L. monocytogenes* em carne suína.

4.4.2. Obtenção da bacteriocina parcialmente purificada para os testes *in situ*

Utilizando-se a metodologia de extração ácida, descrita no item 3.4.2, aplicada ao isolado RJC 1, foi possível obter bacteriocina semi-purificada com atividade antimicrobiana de 204.800 UA/mL.

4.4.3. Determinação do peso molecular da bacteriocina produzida pelo isolado *L. curvatus* RJC 1

Conforme apresentado na Figura 7, correspondente aos dois géis gerados pela eletroforese SDS-PAGE, a bacteriocina produzida pelo isolado *L. curvatus* RJC 1 tem peso molecular entre 1.000 e 3.500 daltons.

Figura 7: SDS-PAGE indicando a faixa de peso molecular da bacteriocina produzida por *L. curvatus* RJC 1. A) após incubação com sobrecamada de BHI semisólido contendo *L. monocytogenes* Scott A; B) após coloração com *Comassie Blue*.

A presença de um único halo de inibição (Figura 7A) sugere que o isolado *L. curvatus* RJC 1 produz um único composto com ação antimicrobiana. Uma purificação mais completa da bacteriocina por cromatografia líquida de alto

desempenho (HPLC), seguida de análise de espectrofotometria de massas das frações com atividade antimicrobiana, poderia determinar se se trata de um ou vários peptídeos ativos.

Deve ser ressaltado que o peso molecular do peptídeo antimicrobiano produzido por *L. curvatus* RJC 1 (entre 1,0 e 3,5 kDa) é ligeiramente inferior ao da maioria das outras bacteriocinas que tiveram o peso molecular determinado também por SDS-PAGE, exceção feita à bacteriocina produzida por *L. plantarum* de peso molecular de 1558,85 Da, descrita por Muller *et al.* (2009). Budde *et al.* (2003) verificaram por esta técnica que o peso molecular de uma bacteriocina produzida por *Leconostoc carnosum*, isolada de presunto suíno fatiado, estava entre 4,6 e 5,3 kDa. Também utilizando SDS-PAGE, Todorov *et al.* (2011) observaram que o peso molecular da bacteriocina produzida por *L. sakei* isolado de salmão defumado era aproximadamente 3,8 kDa. Em outro estudo, Todorov *et al.* (2010a) caracterizaram duas bacteriocinas produzidas por duas cepas diferentes de *L. plantarum*, verificando que uma tinha peso molecular de 3,5 kDa e outra de 10 kDa. Albano *et al.* (2007) caracterizaram duas bacteriocinas produzidas por *Pediococcus acidilactici* e verificaram que o peso molecular de ambas estava entre 3,5 e 6,0 kDa. Todorov e Dicks (2006), caracterizaram 8 bacteriocinas produzidas por cepas das espécies *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. pentosus* e obtiveram valores entre 2,8 e 14 kDa. Ghalfi *et al.* (2010) caracterizaram 3 peptídeos com atividade antimicrobiana produzidos por uma única cepa de *L. curvatus* e, por SDS-PAGE determinaram que seu peso molecular era 6.365, 3.426 e 3.496 Da. Através do sequenciamento das frações com atividade antimicrobiana obtidas por HPLC, os peso moleculares foram mais baixos (1.340,5 1.047,2 e 980 Da, respectivamente), que os autores atribuíram ao sequenciamento incompleto das frações. Héquet *et al.* (2007) caracterizaram de forma mais precisa uma bacteriocina produzida por *L. curvatus* através espectrofotometria de massa que apresentou peso molecular de 4,3628 kDa, mesmo valor encontrado para sakacina X produzida pela cepa *L. sakei* 5.

4.5. Avaliação da atividade *in vitro* da bacteriocina parcialmente purificada frente à *Listeria monocytogenes*

A atividade antimicrobiana da bacteriocina parcialmente purificada produzida pelo isolado *L. curvatus* RJC 1 frente a *L. monocytogenes* Scott A está apresentada na Figura 8, enquanto as Figuras 9 e 10 mostram os resultados frente a diferentes isolados de *L. monocytogenes* provenientes de salsicha e de presunto, respectivamente. Os resultados mostram que a bacteriocina causa um aumento de algumas horas na fase lag de multiplicação dos isolados de *L. monocytogenes*, aumento que varia de isolado para isolado. Para algumas *L. monocytogenes* (90, 512 e 628), a fase lag durou até 9 horas a mais do que o controle sem bacteriocina, já para outras (613), o aumento foi muito menor, de aproximadamente 2 horas.

Figura 8: Multiplicação de *L. monocytogenes* Scott A em caldo BHI a 37°C, na presença (5.120 UA/mL) e ausência da bacteriocina semi-purificada produzida por *L. curvatus* RJC 1

Figura 9: Multiplicação de diferentes cepas de *L. monocytogenes* isoladas de salsicha, em caldo BHI a 37°C, na presença (5.120 UA/mL) e ausência da bacteriocina semi-purificada produzida por *L. curvatus* RJC 1

Figura 10: Multiplicação de diferentes cepas de *L. monocytogenes* isoladas de presunto, em caldo BHI a 37°C, na presença (5.120 UA/mL) e ausência da bacteriocina semi-purificada produzida por *L. curvatus* RJC 1

Como o efeito da bacteriocina frente a *L. monocytogenes* variou de acordo com o isolado, os testes de inibição foram repetidos com os isolados agrupados em pools, de forma a obter um resultado mais amplo e com maior reprodutibilidade. Os

pools foram preparados agrupando-se os isolados de *L. monocytogenes* aleatoriamente. Murphy *et al.* (2005), Barmpalia *et al.* (2005), Glass *et al.* (2007) e Samelis *et al.* (2005) também desenvolveram suas pesquisas de avaliação da atividade bioconservante de alimentos de bacteriocinas de BAL empregando *pools* de cepas, pois este procedimento melhora a reprodutibilidade dos resultados, aproximando-os de uma situação mais real. Os resultados destes testes estão apresentados na Figura 11.

Figura 11: Multiplicação de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de salsicha e presunto, agrupadas em dois pools, em caldo BHI a 37°C, na presença e ausência da bacteriocina semi-purificada produzida por *L. curvatus* RJC 1

Pool 1: isolados 512, 541, 571, 592 e 613 (salsicha) e 90, 108, 179, 268 e 112 (presunto)

Pool 2: isolados 592, 613, 649, 628 e 611(salsicha) e 205, 106, 112, 268 e 90 (presunto)

Com base nos resultados apresentados na Figura 11, para os experimentos de determinação da melhor concentração de bacteriocina e de *L. monocytogenes* para atividade inibitória *in vitro*, formou-se um novo *pool* constituído dos isolados 90, 108, 179, 205 e 268, provenientes de presunto e 512, 541, 613, 628 e 571, provenientes de salsicha.

Conforme indicado na Figura 12, o efeito inibitório da bacteriocina nas três concentrações utilizadas foi o mesmo, com o retardamento do início da fase exponencial dependente da concentração de *L. monocytogenes* no meio. Quanto maior a concentração de *L. monocytogenes*, mais rapidamente as bactérias entraram na fase logarítmica de multiplicação.

Figura 12: Multiplicação do pool de *L. monocytogenes* em diferentes concentrações de inóculo iniciais (10^0 , 10^2 , 10^4 e 10^6 UFC/mL), em caldo BHI contendo diferentes concentrações (0, 600, 1080 e 2048 UA/mL) da bacteriocina parcialmente purificada produzida pelo isolado *L. curvatus* RJC 1, na temperatura de 37°C.

Figura 13: Efeito de diferentes concentrações da bacteriocina parcialmente purificada produzida pelo isolado *L. curvatus* RJC 1 na multiplicação do pool de *L. monocytogenes* em diferentes concentrações iniciais (10^6 , 10^4 , 10^2 , 10^0 UFC/mL), na temperatura de 37°C.

Conforme o esperado, quanto maior a concentração inicial do inóculo mais curta a fase lag, independente da concentração de bacteriocina do meio.

4.6. Avaliação da atividade *in situ* da bacteriocina parcialmente purificada frente à *Listeria monocytogenes* em mortadela fatiada experimentalmente contaminada

A atividade da bacteriocina parcialmente purificada frente à *L. monocytogenes* em mortadela fatiada foi avaliada empregando-se as mesmas concentrações de bacteriocina utilizadas nos testes *in vitro*, ou seja, 3.000 UA/g, 5.400 UA/g e 10.241 UA/g. Essas concentrações foram obtidas transferindo-se 250 µL, 450 µL e 850 µL da bacteriocina parcialmente purificada para a superfície das fatias de mortadela. A concentração do inóculo utilizada para a contaminação das fatias foi de aproximadamente 10^7 UFC/g, e a temperatura de armazenamento foi 37°C para que os resultados fossem evidenciados e obtidos mais rapidamente. Esta temperatura foi também escolhida para possibilitar a comparação dos resultados dos testes *in vitro* e *in situ*. O período de incubação foi de 48h.

Figura 14: Multiplicação do pool de *L. monocytogenes* nas amostras de mortadela fatiada tratadas com diferentes concentrações da bacteriocina parcialmente purificada produzida pelo isolado *L. curvatus* RJC 1

Os resultados da Figura 14 indicam que houve uma redução de 1 a 1,5 ciclos logarítmicos na contagem de *L. monocytogenes* nas primeiras horas após a

contaminação experimental das fatias contendo a bacteriocina parcialmente purificada, dependendo da sua concentração nas fatias. Após essa redução inicial, as contagens de *L. monocytogenes* voltaram a aumentar, e gradativamente atingiram os mesmos valores que os encontrados nas fatias sem bacteriocina após 48h.

Para a avaliação do efeito da bacteriocina parcialmente purificada no controle de *L. monocytogenes* nas fatias de mortadela, bem como na extensão da sua vida-de-prateleira, durante o armazenamento em refrigeração, optou-se por utilizar a concentração de 3.000 UA/g, ou seja, 250 μ L por fatia. As fatias de mortadela utilizadas no experimento foram todas do mesmo fornecedor, do mesmo lote e data de produção e apresentaram características físico-químicas descritas na Tabela 10. As contagens de *L. monocytogenes* foram realizadas de 5 em 5 dias, até 40 dias. Após este período, as amostras já apresentaram sinais visíveis de deterioração, com manchas verdes na superfície das fatias, e foram descartadas.

Tabela 10: Características físico-químicas da amostra de mortadela fatiada utilizada nos experimentos, conforme informado pelo fabricante.

PROTEÍNA (%)	Mínimo 12
GORDURA (%)	19,8 $\pm$ 1,8
UMIDADE (%)	56,36 $\pm$ 2,0
CINZAS (%)	3,87 $\pm$ 0,5
TEOR DE SAL (%)	2,19 $\pm$ 0,23
CARBOIDRATOS TOTAIS (%)	Máximo 10
NITRITO RESIDUAL (mg/kg)	Máximo 150
CÁLCIO (mg/100g)	Máximo 0,9
aW	0,950
pH	6,16 $\pm$ 0,13

Figura 15: Multiplicação do pool de *L. monocytogenes* nas amostras de mortadela fatiada adicionadas (Teste 4) e não adicionadas (Teste 3) da bacteriocina parcialmente purificada produzida pelo isolado *L. curvatus* RJC 1

Figura 16: Enumeração de bactérias lácticas nas amostras de mortadela fatiada durante armazenamento em refrigeração onde Teste 1: Controle (sem bacteriocina, sem *L. monocytogenes*); Teste 2: Com bacteriocina, sem *L. monocytogenes*; Teste 3: Sem bacteriocina, com *L. monocytogenes*; e Teste 4: Com bacteriocina, com *L. monocytogenes*

Tabela 11: Enumeração* (log UFC/g) de *L. monocytogenes* nas fatias de mortadela artificialmente contaminadas, adicionadas (teste T4) e não adicionadas (Teste T3) da bacteriocina parcialmente purificada produzida pelo isolado *L. curvatus* RJC 1, durante armazenamento em refrigeração

Teste	Dia 0	Dia 5	Dia 10	Dia 15	Dia 20	Dia 25	Dia 40
T3	3,02 ± 0,04 ^{a, AB}	3,01 ± 0,03 ^{a, BC}	3,08 ± 0,07 ^{a, ABC}	3,15 ± 0,07 ^{a, AB}	3,24 ± 0,09 ^{a, A}	2,9 ± 0,1 ^{a, C}	3,0 ± 0,1 ^{a, BC}
T4	1,9 ± 0,1 ^{b, A}	1,98 ± 0,07 ^{b, A}	1,7 ± 0,3 ^{b, A}	1,4 ± 0,2 ^{b, A}	1,5 ± 0,9 ^{b, A}	1,1 ± 0,9 ^{b, A}	1,0 ± 0,9 ^{b, A}

*media +/- desvio padrão de 6 determinações.

Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o nível de significância de 5%.

Letras minúsculas são relativas aos resultados para um mesmo dia de análise.

Letras maiúsculas são relativas aos resultados para os diferentes dias de análise de um mesmo teste.

Tabela 12: Enumeração (log UFC/g) de bactérias lácticas nas fatias de mortadela para os testes T1, T2, T3, e T4.

Teste	Dia 0	Dia 5	Dia 10	Dia 15	Dia 20	Dia 25	Dia 30	Dia 40
T1	5,7 ± 0,3 ^{a, D}	8,0 ± 0,1 ^{a, C}	8,91 ± 0,07 ^{a, BC}	9,1 ± 0,9 ^{a, B}	9,2 ± 0,6 ^{bc, B}	10,6 ± 0,7 ^{a, A}	11,0 ± 0,2 ^{a, A}	11,2 ± 0,2 ^{ab, A}
T2	6,7 ± 0,9 ^{a, C}	8,5 ± 0,3 ^{a, B}	8,97 ± 0,07 ^{a, B}	9,1 ± 0,8 ^{a, B}	10,6 ± 0,1 ^{a, A}	10,7 ± 0,3 ^{a, A}	11,21 ± 0,04 ^{a, A}	11,0 ± 0,4 ^{b, A}
T3	6,1 ± 0,2 ^{a, D}	8,3 ± 0,2 ^{a, C}	8,88 ± 0,09 ^{a, C}	9,1 ± 0,5 ^{a, C}	9,0 ± 0,8 ^{c, C}	10,2 ± 0,6 ^{a, B}	10,6 ± 0,5 ^{a, AB}	11,5 ± 0,1 ^{a, A}
T4	6,8 ± 0,1 ^{a, D}	8,4 ± 0,2 ^{a, C}	8,9 ± 0,2 ^{a, BC}	8,9 ± 0,6 ^{a, C}	10 ± 1 ^{ab, A}	10,3 ± 0,8 ^{a, A}	9,9 ± 0,4 ^{b, AB}	11,1 ± 0,5 ^{b, A}

*media +/- desvio padrão de 6 determinações.

Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o nível de significância de 5%.

Letras minúsculas são relativas aos resultados para um mesmo dia de análise.

Letras maiúsculas são relativas aos resultados para os diferentes dias de análise de um mesmo teste.

T1: Controle (sem bacteriocina, sem *L. monocytogenes*);

T2: Com bacteriocina, sem *L. monocytogenes*;

T3: Sem bacteriocina, com *L. monocytogenes*;

T4: Com bacteriocina, com *L. monocytogenes*

Após a adição da bacteriocina parcialmente purificada às fatias, ocorreu uma redução imediata de 1 ciclo logarítmico na população inicial de *L. monocytogenes* ($p < 0,05$), conforme indicado na Figura 15 e Tabela 11. Após esta redução, verificou-se que as contagens de *L. monocytogenes* permaneceram estáveis durante todo o período de armazenamento. As contagens permaneceram estáveis também nas fatias de mortadela não adicionadas da bacteriocina durante todo o período de estudo.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por outros autores, que também verificaram uma redução inicial na população de *L. monocytogenes* logo após a adição de bacteriocinas. No entanto, em nem todos os estudos, o efeito bacteriostático após esta redução foi o mesmo observado neste trabalho. Samelis *et al.* (2005) verificaram uma redução inicial de 1,0 – 1,5 log UFC/cm² na população de *L. monocytogenes* devido à adição de nisina a mortadela suína fatiada, observando também o efeito bacteriostático posterior, mantido por 10 dias de armazenamento a 4°C. Jofré *et al.* (2009) verificaram uma redução imediata, de 3 log UFC/g, de *L. monocytogenes* pela aplicação de 256 UA/g de enterocina A e B em produto tipo salame, e dependendo da quantidade de bacteriocina adicionada, ela foi capaz de manter essa inibição por períodos mais longos. Em outro estudo, 10 UA/g de uma enterocina foi capaz de reduzir a população inicial de *L. monocytogenes*, contudo o patógeno voltou a se multiplicar durante o processo de fermentação do salame.

Um resultado inesperado foi o que o *pool* de *L. monocytogenes* não se multiplicou nas fatias de mortadela sem bacteriocina durante o armazenamento em refrigeração. A capacidade de *L. monocytogenes* se multiplicar em produtos cárneos em temperatura de refrigeração de até 4°C é bem documentada. No contexto do estudo da atividade antilisterial de bacteriocinas nestes produtos, pode-se citar o trabalho de Barmpalia *et al.* (2005), que testaram a ação de diacetato de sódio, lactato de sódio, e glucona-delta-lactona, adicionados à massa de mortadela suína, em inibir um *pool* de 10 isolados de *L. monocytogenes* durante armazenamento a 4 e 10°C. Nas amostras sem adição dos antimicrobianos, *L. monocytogenes* foi capaz de se multiplicar, passando de uma população inicial de 3-4 log UFC/cm² para 8,3 log UFC/cm² em 10 dias a 4°C e para 8,7 log UFC/cm² em 12 dias a 10°C. Também Samelis *et al.* (2005) avaliaram a combinação de nisina com outros antimicrobianos para inibir *L. monocytogenes* em mortadela suína fatiada e verificaram que o

patógeno foi capaz de se multiplicar a 4°C, passando de uma população inicial de 2-3 log UFC/cm² para 6-7 log UFC/cm² em 20 dias de armazenamento.

Nufer *et al.* (2007) avaliaram a multiplicação de 6 diferentes cepas de *L. monocytogenes in vitro* e verificaram que existe diferença significativa ($p < 0,05$) nos resultados de multiplicação a 4°C e a 7°C. Duas dessas cepas foram adicionadas à mortadela fatiada, verificando-se que a multiplicação das cepas no produto armazenado a 4°C e a 7°C foi significativamente diferente. Em presença de lactato de potássio incluído na formulação da mortadela, o comportamento das cepas também foi diferente, sendo uma mais sensível que a outra. A partir de uma mesma população inicial de 2 log UFC/g, uma delas atingiu a contagem de 6 log UFC/g mesmo na presença do inibidor, tanto a 4°C quanto a 7°C, enquanto a outra atingiu no máximo 3 log UFC/g e 4 log UFC/g a 4°C e 7°C, respectivamente. Este estudo mostra que, pelo menos para *L. monocytogenes*, a resposta a cada barreira antimicrobiana imposta é cepa dependente, daí a importância de se trabalhar com um *pool* de cepas, como feito no presente estudo.

Porém, os resultados obtidos neste estudo indicam que todos os isolados presentes no *pool* foram inibidos por algum fator além da presença de bacteriocina, visto que a inibição correu também na mortadela controle sem bacteriocina. De acordo com a informação que consta na embalagem, a mortadela utilizada no experimento contém nitrito de sódio como conservante. A possível ação deste conservante na inibição de *L. monocytogenes* pode ser descartada, pois esse conservante é pouco ativo contra este patógeno (ROUCURT *et al.* (2000) *apud*. KOUAKOU *et al.* (2009)). Xi *et al.* (2011), trabalhando com produtos cárneos curados, observaram que para inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* no produto é necessário adicionar no mínimo 150 ppm de nitrito de sódio, verificando que se a quantidade adicionada for inadequada, o patógeno poderá se multiplicar. Kouakou *et al.* (2009) também verificaram que, em produtos de carne suína, o nitrito apresentou apenas leve efeito inibitório na multiplicação de *L. monocytogenes*. A legislação brasileira para carnes e produtos cárneos, através da Portaria nº1004 de 11 de dezembro de 1998, estabelece que o limite máximo de nitrito residual no produto acabado é de 0,015 g/100g (150 ppm) de produto (BRASIL, 1998). Assim, acredita-se que a ação do nitrito como inibidor de *L. monocytogenes* na mortadela estudada não tenha sido relevante.

Outro fator a considerar são os microrganismos naturalmente presentes na mortadela, que podem ter tido um efeito bacteriostático sobre os isolados de *L. monocytogenes*. Observou-se que a concentração de bactérias lácticas no produto foi elevada, da ordem de 10^6 UFC/g no início dos experimentos, aumentando para até 10^{11} UFC/g durante o armazenamento (Figura 16). Foi observado também que a bacteriocina produzida pelo isolado RJC 1 teve pouca ou nenhuma ação inibitória sobre as bactérias lácticas presentes na mortadela (Figura 16). Esses resultados contrastam com os reportados por Aymerich *et al.* (2002), que obtiveram resultados positivos na inibição de BAL deteriorantes, produtoras de limo, em presunto suíno fatiado embalado à vácuo quando foram aplicadas cepas produtoras de bacteriocina como cultura protetora. Por outro lado, Alves *et al.* (2006), ao avaliar o impacto de uma cepa BAL produtora de bacteriocina e uma não produtora de bacteriocina na multiplicação de *L. monocytogenes* em presunto suíno fatiado e embalado à vácuo, concluíram que a inibição da *L. monocytogenes* ocorreu não pela ação da bacteriocina em si, mas principalmente pela presença de uma microbiota competitiva em alta concentração.

Mellefont e Ross (2007) concluíram que a presença de alta concentração de bactérias lácticas cria um obstáculo adicional aos microrganismos presentes em menor número. Esse fenômeno, conhecido por *Jameson Effect*, corresponde à situação em que todas as bactérias presentes em determinado ambiente atingem a fase estacionária quando uma das espécies presentes entra em fase estacionária, independentemente da concentração populacional que tenham no momento. Hwang e Sheen (2011) estudaram a influencia da microbiota nativa (*Brochothrix* spp.) na multiplicação de *L. monocytogenes* inoculada em presunto suíno fatiado, armazenado em diferentes temperaturas, e concluíram que a microbiota nativa provocou uma redução na taxa de multiplicação e na densidade populacional final de um pool de 5 cepas de *L. monocytogenes* em temperaturas de armazenamento de até 8°C. A influência da microbiota diminuiu com o aumento da temperatura de armazenamento. Citando Malkar *et al.* (2003), que usaram a microbiologia preditiva para avaliar a interação entre estes microrganismos, os autores concluíram que o efeito inibitório na multiplicação de um patógeno só ocorre quando a população da microbiota competitiva alcança concentrações de 10^8 UFC/mL.

Também Gram *et al.* (2002) concluíram que, quando microrganismos deteriorantes atingem a concentração de $10^7 - 10^9$ UFC/g, passam a influenciar a

multiplicação de outros micro-organismos presentes no produto. Os autores também citam o *Jameson Effect* - a supressão de uma população em detrimento de outra que já atingiu concentrações mais elevadas - como uma importante forma de interação entre bactérias presentes no produto. Cornu *et al.* (2011) também estudaram o efeito de bactérias lácticas na multiplicação de *L. monocytogenes* em carne suína, através de um modelo matemático baseado no *Jameson Effect*, e constataram que uma alta concentração de bactérias lácticas pode inibir a multiplicação de *L. monocytogenes*.

Segundo Mellefont e Ross (2007), as indústrias, ao quererem aumentar a vida de prateleira de seus produtos através da diminuição da multiplicação de microrganismos deteriorantes como bactérias lácticas, podem acabar viabilizando a multiplicação de alguns patógenos, como *L. monocytogenes*. A multiplicação de *L. monocytogenes* pode ser retardada pelos conservantes adicionados, porém, devido ao prolongamento da vida de prateleira, essa multiplicação pode acontecer. Os autores concluem o trabalho afirmando que essa equação de prolongamento da vida de prateleira com minimização do risco de contaminação por patógenos deve ser muito bem estudada e pensada pelas indústrias, merecendo avaliação caso a caso. Qvist *et al.* (1994) também chamam a atenção para a possibilidade da remoção drástica dos microrganismos deteriorantes criar uma situação favorável para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, ressaltando a importância da criação de obstáculos eficazes em produtos que são manipulados após tratamento térmico.

Theron e Lues (2007) ressaltam que as inovações tecnológicas deverão garantir a inocuidade dos alimentos e, ao mesmo tempo, as necessidades dos consumidores, ressaltando a importância de se estudar a fundo todas as alternativas que surgem. Weiss *et al.* (2010), em uma revisão bibliográfica, avaliaram os avanços tecnológicos em ingredientes e processos para a indústria de produtos cárneos, concluindo que falta fundamentação científica sólida para juntar os novos sistemas de ingredientes com os processos de operações mais modernos. Para os autores, fabricantes de equipamentos, engenheiros de processos e cientistas devem trabalhar em parceria para cobrir essa lacuna na base de conhecimento e assim fazer com que as indústrias de produtos cárneos prosperem.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram outros trabalhos já realizados que evidenciam claramente que bacteriocinas de bactérias lácticas tem um potencial

tecnológico como agentes de bioconservação de produtos cárneos prontos para consumo. No entanto, o controle efetivo de *Listeria monocytogenes* nestes produtos depende do uso combinado destas bacteriocinas com outras barreiras que limitem ou bloqueiem a multiplicação deste patógeno.

5. CONCLUSÕES

- As mortadelas fatiadas presentes no mercado de São Paulo podem ser fonte de bactérias láticas produtoras de bacteriocinas, que podem ter importante papel na conservação do produto.
- O isolado *L. curvatus* RJC1, obtido de mortadela fatiada, apresenta interesse tecnológico como bio-conservante uma vez que produz uma bacteriocina resistente a diversas condições de pH, temperatura e concentração salina, com atividade contra uma série de micro-organismos deteriorantes e patogênicos.
- A bacteriocina produzida pelo isolado *L. curvatus* RJC 1 apresenta potencial de aplicação em produtos cárneos fatiados, sendo um importante obstáculo no controle de *L. monocytogenes* quando aplicada após a etapa de fatiamento.
- A bacteriocina produzida pelo isolado *L. curvatus* RJC 1 não interferiu na população de bactéria lática naturalmente presente no produto e portanto não influenciou na VDP do produto.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBANO, H.; PINHO, C.; LEITE, D.; BARBOSA, J.; SILVA, J.; CARNEIRO, L.; MAGALHAES, R.; HOGG, T.; TEIXEIRA, P. Evaluation of a bacteriocin-producing strain of a *Pedococcus acidilactici* as a biopreservative for “Alheira”, a fermented meat sausage. **Food Control**, v.20, p. 764-770, 2009

ALBANO, H.; TODOROV, S.D.; VAN REENEN, C.; HOGG, T.; DICKS, L.M.; TEIXEIRA, P. Characterization of two bacteriocins produced by *Pedococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. **International Journal of Food Microbiology** v. 116 p. 239–247, 2007.

ALVES, V.F.; MARTINEZ, R.C.R; LAVRADOR, M.A.S, De MARTINIS, E.C.P. Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. **Meat Science** v. 74 p.623–627, 2006

ANGELIDIS, A. S.; KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and Concentration of *Listeria monocytogenes* in Sliced Ready-to-Eat Meat Products in the Hellenic Retail Market. **Journal of Food Protection**, v. 69, n.4, p.938–942, 2006

AYMERICH, M.T.; GARRIGA, M.; COSTA, S.; MONFORT, J.M.; HUGAS, M. Prevention of ropiness in cooked pork by bacteriocinogenic cultures. **International Dairy Journal** v. 12 p. 239–246, 2002

BARBOSA, M. S. **Avaliação da ação de ingredientes da matriz alimentar na atividade ant-listeria das bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus sakei* subsp *sakei* 2a**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, 117 p.; 2009.

BARI, M.I.; UKUKU, D.O.; KAWASAKI, T.; INATSU, Y.; ISSHIKI, K.; KAWAMOTO, S. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid phytic acid and potassium sorbate e EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh cut produce. **Journal of food protection** v. 68, n. 7 p. 1381-1387, 2005.

BARMPALIA, I.M.; KOUTSOUMANIS, K.P.; GEORNARAS, I.; BELK, K.E.; SCANGA, J.A.; KENDALL, P.A.; SMITH, G.C.; SOFOS, J.N., Effect of antimicrobials as ingredients of pork bologna for *Listeria monocytogenes* control during storage at 4 or 10°C **Food Microbiology** v. 22, p. 205-211, 2005.

BENKERROUM, N.; DAOUDI, A.; HAMRAOUI, T.; GHALFI, H.; DUROY, M.; EVRART, P. Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* as potential protective adjuncts to control

Listeria monocytogenes in dry-fermented sausages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 56–63, 2005.

BERSOT, L.S.; GILLIO, C.; TAVOLARO, P.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.G.M.; DESTRO, M.T. Behaviour of *L. monocytogenes* in sliced, vacuum-packed mortadella. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 514-516, 2008.

BERTHIER, F.; EHRLICH, S.D. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. **FEMS Microbiology Letters**, v. 161, p. 97-106, 1998.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 1996. Portaria DETEN/MS nº 29 de 22 de janeiro de 1996. Aprova a extensão de uso da NISINA com a função de conservador para queijos pasteurizados. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/29_96.htm#. Acesso em: 17 de junho de 2011.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2001. Legislação. VisaLegis. Resolução RDC n.12, de 2 de janeiro de 2001a. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=>. Acesso em: 19 de maio de 2011

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). 1998 Portaria nº 1.004, de 11 de dezembro de 1998. Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1004_98.htm Acesso em 19/05/2011

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 1998. Autorização de uso de produto. Ofício: AUP/DOI/DIPOA nº 563/98.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.1-17, 1999.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; ZAGANINI, C.L.; DELBONI, R.R.; OLIVEIRA, J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 137-144, 2004.

BUDDE, B. B.; HORNBAEK, T.; JACOBSEN, T.; BARKHOLT, V.; KOCH, A.G. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. **International Journal of Food Microbiology**, v.83 p.171–184, 2003

CARPENTIER, B.; CERF, O. Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology** v. 145 p. 1–8, 2011

CASTRO, M.P.; PALAVECINO, N.Z.; HERMAN, C.; GARRO, O.A.; CAMPOS, C.A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. **Meat Science** v. 87, p. 321–329, 2011.

CINTAS, L.M.; CASAUS, M.P.; HERRANZ, C.; NES, L.F.; HERNADEZ, P.E. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 7, p. 281-305, 2001.

CORNU, M. BILLOIR, E.; BERGIS, H.; BEAUFORT, A.; ZULIANI, V. Modeling microbial competition in food: Application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. **Food Microbiology**, v. 28, p. 639-647, 2011.

COTTER, P.D.; HILL, C. ROSS, R.P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews: Microbiology** V. 3 p. 777-788, 2005.

DALIÉ, D.K.D.; DESCHAMPS, A.M.; RICHARD-FORGET, F.; Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control** v. 21 p. 370–380, 2010.

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

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

DE MARTINIS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G.M., Inhibition of Foodborne Pathogens by Bacteriocin-producing *Leuconostoc sp* and *Lactobacillus sake* Isolated from “Lingüiça Frescal”. **Rev. de Microbio.**, V. 15, pg. 284-287, 1997.

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

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

DE MARTINIS, E.C.P.; FREITAS, F.Z Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. **Food Control** v. 14 p. 197–200, 2003.

DICKS, L.M.T.; MELLET, F.D.; HOFFMAN, L.C. Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. **Meat Science**, v.66, p.703–708, 2004.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HÉCHARD, Y.; MCMULLEN, L.M.; PRÉVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocina. **Microbio. and Mol. Bio. Rev.**, 70 (2), 564-582, 2006.

ESWARANANDAM, S.; HETTIARACHCHY, N.S.; JOHNSON, M.G. Antimicrobial activity of citric, lactic malic or tartaric acids and nisin incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella gaminara*. **Journal of Food Science**, v.69, n.3, 2004.

FELSKE, A. RHEIMS, H. WOLTERNIK, A. STACKEBRANDT, E. AKKERMANS, A.D. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils, **Microbiology**, v. 143 p. 2983-2989, 1997.

FOONG, S. C. C.; DICKSON, J. S. Attachment of *Listeria monocytogenes* on Ready-to-Eat Meats. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 3, p. 456–462, 2004.

FURTADO, D.N. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo fresco de leite de cabra**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, 87p., 2010.

GAGGIA, F.; DI GIOGIA, D.; BAFFONI, L.; BIAVATI, B. The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. **Trends in Food Science & Technology**. Article in press p. 1-9, 2011.

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

GALVEZ, A.; LOPEZ, R.L.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N. B.; Application of Bacteriocins in the Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 125–152, 2008

GALVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; BENOMAR, N.; LUCAS, R. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. **Current Opinion in Biotechnology** v. 21, p. 142–148, 2010

GHALFI, H.; BENKERROUM, N.; ONGENA, M.; BENSALD, M.; THONART, P. Production of three anti-listerial peptides by *Lactobacillus curvatus* in MRS broth. **Food Research International**, v. 43 p. 33–39, 2010.

GLASS, K. A.; MCDONNELL, L.M.; RASSEL, R.C.; ZIERKE, K. Controlling *Listeria monocytogenes* on sliced ham and turkey products using benzoate, propionate and sorbate. **Journal of Food Protection** v.70, n.10, p. 2306-2312, 2007.

GOMBAS, D. E.; CHEN, Y.; CLAVERO, R. S.; SCOTT, V. N. Survey of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 4, p. 559–569, 2003.

GRAM, L.; RAVN, L.; RASCH, M.; BRUHN, J.B.; CHRISTENSEN, A.B.; GIVSKOV, M. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p.79– 97, 2002.

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

GUINANE, C.M.; COTTER, P.D.; HILL, C. ROSS, R.P. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98 p. 1316-1325, 2005.

HAVELAAR, A. H.; BRUL, S.; JONG, A.; JONGE, R.; ZWIETERING, M.H.; KUILE, B.H. Future challenges to microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. S79-S94, 2010.

HENG, N.C.K.; WESCOMBE, P.A.; BURTON, J.P.; JACK, R.W.; TAGG, J.R. The diversity of bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. In: RILEY, M.A.; CHAVAN, M. (eds) **Evolution and ecology of bacteriocins** Springer Inc. New York, p. 45-92, 2007.

HEQUET, A.; LAFFITTE, V.; SIMON, L.; DE SOUZA-CAETANO, D.; THOMAS, C.; FREMAUX, C.; BERJEAUD, J.M. Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. **International Journal of Food Microbiology** v. 113. p. 67-74, 2007.

HOLLEY, R.,A.; McKELLAR, R., C., Influence of unsliced delicatessen meat freshness upon bacterial growth in subsequently prepared vacuum packed slices. **International Journal of Food Microbiology** v. 29 p. 297-309, 1996.

HWANG, C.-A.; SHEEN, S. Growth Characteristics of *Listeria monocytogenes* as affected by Native Microflora in Cooked Ham under Refrigerated and temperature Abuse Conditions. **Food Microbiology**, v. 28, p. 350-355, 2011

IVANEK, R.; GROHN, Y. T.; TAUER, L. W.; WIEDMANN, M. The Cost and Benefit of *Listeria monocytogenes*: Food Safety Measures. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44 (7), p. 513 — 523, 2004

JACK, R.W.; WAN, R.; GORDON, J.; HARMARK, K.; DAVIDSON, B.E.; HILLIER, A.J.; WETTENHALL, R.E.H.; HICKEY, M.W.; CONVENTRY, M.J.; Characterization of the Chemical and Antimicrobial Properties of Piscolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* J126. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 62, n. 8, p. 1996.

JAY, J.M.; LOESSNER, M., GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology** 7th Edition, Springer, New York, NY, USA, 790 p., 2005.

JOFRÉ, A.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T. Inhibition of *Salmonella* sp. *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. **Meat Science** v.78, p. 53-59, 2008.

JOFRÉ, A.; AYMERICH, T.; GARRIGA, M.; Improvement of the food safety of low acid fermented sausages by enterocins A and B and high pressure. **Food Control**, v. 20, p. 179-184, 2009.

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

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, p. 298-304, 2008.

KOUAKOU, P.; GHALFI, H.; DESTAIN, J.; DUBOIS-DAUPHIN, R.; AVRARD, P.; THONART, P.; Effects of curing sodium nitrite additive and natural meat fat on growth control of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CWBI-B28. **Food Microbiology** v.26, p. 623–62, 2009.

LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P.A.; LE FLECHE-MATEOS, A.; ROCHE, S.M.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; LE MONNIER, A.; LECUIT, M.; ALLERBERGER, F. *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, n.9, p2210-2214, 2009.

LEE, J.; JANG, J.; KIM, B.; KIM, J.; JEONG, G.; HA, H. Identification of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* by multiplex PCR-based restriction enzyme analysis. **Journal of Microbiological Methods** v. 59 p.1 – 6, 2004,

LEGAN, J. D.; SEMAN, D. L.; MILKOWSKI, A. L.; HIRSCHEY, J. A.; VANDEVEN, M. H. Modeling the Growth Boundary of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Cooked Meat Products as a Function of the Product Salt, Moisture, Potassium Lactate, and Sodium Diacetate Concentrations. **Journal of Food Protection** v.67, n. 10, p. 2195–2204, 2004.

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

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

LIANOU, A.; GEORNARAS, I.; KENDALL, P.A.; BELK, K.E.; SCANGA, J.A.; SMITH, G.C.; SOFOS, J.N. Fate of *Listeria monocytogenes* in commercial ham, formulated with or without antimicrobials, under conditions simulating contamination in the processing or retail environment and during home storage. **Journal of Food Protection** v.70, n. 2, p. 378-85.

LIANO, A.; SOFOS, J.N.; A Review of the Incidence and Transmission of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Products in Retail and Food Service Environments. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 9, Pages 2172–2198, 2007.

LISERRE, A.M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage. **Meat Science** v.61, p. 449-455, 2002.

LUBER, P.; CRERAR, S.; DUFOUR, C.; FARBER, J.; DATTA, A.; TODD, E.C.D.; Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization e Recommendations for improved prevention and control. **Food Control** v. 22 p. 1535-1549, 2011

LUCHANSKY, J.B.; CALL, J.E.; HRISTOVA, B.; RUMERY, L.; YODER, L.; OSER, A. Viability of *Listeria monocytogenes* on commercially-prepared hams surface treated with acidic calcium sulfate and lauric arginate and stored at 4 °C. **Meat Science** v. 71 p. 92–99, 2005.

MAKS, N.; ZHU, L.; JUNEJA, V., K., RAVISHANKAR, S. Sodium lactate, sodium diacetate and pediocin: Effects and interactions on the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* on bologna. **Food Microbiology** v. 27, p. 64-69, 2010.

MARTINS, E.A.; LEAL GERMANO, P.M. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification and serotyping. **Food Control**, v. 22, p. 297-302, 2011.

MATARAGAS, M.; DORSINOS, E.H.; METAXOPOULOS, J. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2°C. **Food Microbiology**, v. 20, p. 259-265, 2003.

MATARAGAS, M.; DORSINOS, E.H. Shelf life establishment of a sliced, cooked, cured meat product based on quality and safety determinants. **Journal of Food Protection**, v.70, n.8, p.1881-1889, 2007.

MELLEFONT, L.A.; ROSS, T. Effect of Potassium Lactate and a Potassium Lactate-Sodium Diacetate Blend on *Listeria monocytogenes* Growth in Modified Atmosphere Package Sliced Ham. **Journal of Food Protection** v.70, n. 10 p. 2297-2305, 2007.

MULLER, D.M.; CARRASCO, M.S.; TONARELLI, G.G.; SIMONETTA, A.C. Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* Ip 31 strain isolated from dry-fermented sausage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 2031-2040, 2009

MURPHY, R.Y.; HANSON, R.E.; DUNCAN, L.K.; FEZE, N.; LYON, B.G. Considerations for post-lethality treatments to reduce *Listeria monocytogenes* from fully cooked bologna using ambient and pressurized steam **Food Microbiology** v.22 p. 359-365, 2005.

NASCIMENTO, M.S.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology** v.11, n.2, p. 120-127, 2008.

NEWELL, D.G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; VAN DER GIESSEN, J.; KRUSE, H. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology** v. 139 p. S3–S15, 2010.

NUFER, U.; STEPHAN, R.; TASARA, T. Grow characteristics of *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri* and *Listeria innocua* strains in broth cultures and a sliced bologna-type product at 4 ad 7 C. **Food Microbiology**, v.24, p.444-451, 2007.

PAL, A.; LABUZA, T.P.; GONZALEZ, F.D. Shelf life evaluation for ready to eat sliced uncured turkey breast and cured ham under probable storage conditions based on *Listeria monocytogenes* and psychrotroph growth. **International Journal of Food Microbiology** v. 126. P. 49-56, 2008.

PEREZ-RODRIGUES, F.; VALERO, A.; TODD, E.C.D.; CARRASCO, E.; GARCIA-GIMENO, R.M., ZURERA, G. Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of cooked meat product. **Meat Science** v.76, p. 692-699, 2007.

PORTO-FETT, A.C.S.; CAMPANO, S.G.; SMITH, J.L.; OSER, A.; SHOYER, B.; CALL, J.E.; LUCHANSKY, J.B. Control of *Listeria monocytogenes* on commercially-produced frankfurters prepared with and without potassium lactate and sodium diacetate and surface treated with lauric arginate using the Sprayed Lethality in Container (SLIC™) delivery method. **Meat Science** v..85 p. 312–318, 2010.

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

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 in Food Science & Technology** Article in press p. 1-9, 2011

RAY, B.; MILLER, K.W. Bacteriocins other than nisin: the pediocin-like cystibiotics of lactic acid bacteria. In: **Natural antimicrobials for the minimal processing of foods**. (Editado por Roller, S.) CRC Press, Boca Raton, Florida, 306 pp.; 2003.

ROLLER, S. 1. Introduction In: **Natural antimicrobials for the minimal processing of foods**. (Editado por Roller, S.) CRC Press, Boca Raton, Florida, 306 pp.; 2003.

ROSA, C.M.; FRANCO, B.D.G.M.; MONTVILLE, T.J., CHIKINDAS, M.L Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolated, *Lactobacillus sake* 2a. **J. Food Safety**, v.22, p.39-54, 2002.

SAMELIS, J.; SOFOS, J.N.; KAIN, M.L.; SCANGA, J.A.; BELK, K.E.; SMITH, G.C. Organic acids and their salts as dipping solutions to control *Listeria monocytogenes* inoculates following processing of sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. **Journal of Food Protection**, v. 64, n.11, p. 1722-1729, 2001.

SAMELIS, J.; SOFOS, J.N. Organic Acids. In: **Natural antimicrobials for the minimal processing of foods**. (Editado por Roller, S.) CRC Press, Boca Raton, Florida, 306 pp.; 2003.

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

SANTIAGO-SILVA, P.; SOARES, N.F.F.; NÓBREGA, J.E.; JUNIOR, M.A.W.; BARBOSA, K.B.F.; VOLP, A.C.P.; ZERDAS, E.R.M.A.; WURLITZER, N.J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control** v.20, p. 85-89, 2009.

SÃO PAULO. Centro de vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac (CVE). 2011. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar – CVE-SES/SP Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/hidri_estat.html Acesso em 26/05/2011

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368-379, 1987

SKANDAMIS, P.N.; TOON, Y.; STOPFORTH, J.D.; KENDALL, P. A.; SOFOS, J.N. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. **Food Microbiology**, v. 25, p. 294-303, 2008

SOOMRO, A.H.; MASUD, T.; ANWAAR, K. Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Human Health – A review. **Pakistan Journal of Nutrition** v.1, n.1, p. 20-24, 2002.

SZABO, E.A.; CAHILL, M.E. The combined affects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTA 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, p.21-31. 1998.

THERON, M.M.; LUES, J.F.R.; Organic Acids and Meat Preservation: A Review. **Food Reviews International**, v. 23, p. 141-158, 2007.

TODD, E.C.D.; NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **Food Control** v. 22 p. 1484-1490, 2011

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Screening of lactic-acid bacteria from South African barley beer for the production of bacteriocin-like compounds. **Folia Microbiol** v. 49 p. 406–410, 2004

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. **Process Biochemistry** v. 40 p. 365–370, 2005.

TODOROV, S.D.; DICKS, Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria, Comparison of the bacteriocins. **Process Biochemistry** v.41, p.11–19, 2006.

TODOROV, S.D.; HO, P.; VAZ-VELHO, M.; DICKS, L.M.T. Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. **Meat Science**, v. 84 p. 334–343, 2010 a.

TODOROV, S.D.; WACHSMAN, M. TOMÉ, E.; DOUSSET, X. DESTRO, M.T.; DICKS, L.M.T.; FRANCO, B.D.G.M.; VAZ-VELHO, M.; DRIDER, D. Characterization of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. **Food Microbiology**. v. 27, p 869-879, 2010 b.

TODOROV, S.D.; RACHMAN, C.; FOURRIER, A.; DICKS, L.M.T.; VAN REENEN, C.A.; PREVOST, H. DOUSSET, X. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. **Anaerobe**, v. 17, p. 23-31, 2011.

URSO, R., RANTSIOU, K.; CANTONI, C.; COMI, G.; COCOLIN, L. Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 232-239, 2006.

VAN REENEN, C.A.; DICKS, L.M.T; CHIKINDAS, M.L. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology** v. 84, p. 1131-1137, 1998.

VERMEIREN, L., DEVLIEGHERE, F., DEBEVERE, J. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the bioprotection of cooked meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 149-164, 2004.

VERMEIREN, L., DEVLIEGHERE, F., DEBEVERE, J. Co-culture experiments demonstrate the usefulness of *Lactobacillus sakei* 10A to prolong the shelf-life of a model cooked ham. **International Journal of Food Microbiology** v. 108 p. 68 – 77, 2006.

VORST, K. L., TODD, E. C. D., RYSER, E. T. Transfer of *Listeria monocytogenes* during Mechanical Slicing of Turkey Breast, Bologna, and Salami. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 3, p. 619–626, 2006.

WARRINER, K.; NAMVAR, A. What is the hysteria with Listeria? **Trends in Food Science & Technology** v. 20, p. 245-254, 2009

WEISS, J., GIBIS, M., SCHUH, V., SALMINEN, H. Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. **Meat Science** v.86, p. 196-213, 2010.

XI, Y.; SULLIVAN, G.A.; JACKSON, A.L.; ZHOU, G.H.; SEBRANEK, J.G. Use of natural antimicrobials to improve the control of *Listeria monocytogenes* in a cured cooked meat model system. **Meat Science**, doi:10.1016/j.meatsci.2011.01.036, 2011.

Xi, Y.; SEBRANEK, J.G.; ZHOU, G.H. Use of natural antimicrobials to improve the control of *Listeria monocytogenes* in a model cured meat system. **Meat Science**, v. 86, n. 3, p. 569, 2010

XIRAPHI, N.; GEORGALAKI, M.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.; TSAKALIDOU, E.; DROSINOS, E.H. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Meat Science** V. 80, p.194–203, 2008.

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