

VANESSA DI RAIMO

**ATIVIDADE ANTI- *Listeria* DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE  
NEGATIVOS ISOLADOS DE SALAME TIPO ITALIANO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2010

VANESSA DI RAIMO

**ATIVIDADE ANTI- *Listeria* DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE  
NEGATIVOS ISOLADOS DE SALAME TIPO ITALIANO**


Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de setembro de 2010.

  
Prof.<sup>a</sup>. Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Co-orientadora)

  
Prof.<sup>a</sup>. Regina Célia Santos Mendonça  
(Co-orientadora)

  
Prof.<sup>a</sup>. Miriam Teresinha dos Santos

  
Dra. Rosinéa Aparecida de Paula

  
Prof.<sup>a</sup>. Célia Alencar de Moraes  
(Orientadora)

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

D597a  
2010

Di Raimo, Vanessa, 1985-

Atividade anti - *Listeria* de estafilococos coagulase nega-  
tivos isolados de salame tipo italiano / Vanessa Di Raimo.

- Viçosa, MG, 2010.

xvi, 52f. : il. ; 29cm.

Orientador: Célia Alencar de Moraes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 42-52.

1. Alimentos - Microbiologia. 2. Segurança alimentar.  
3. Embutidos (Alimentos). I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 664.001579

Ao meu pai Rosino (*in memoriam*)  
à minha mãe Angela e  
às minhas irmãs.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todo amor.

A minha família por estar sempre presente, apesar da distância.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do Curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Professora Célia Alencar de Moraes, pelas orientações e ensinamentos que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

As Professoras Maria Cristina Dantas Vanetti e Regina Célia Santos Mendonça, pelas sugestões e acompanhamento durante este trabalho.

Aos professores Míriam Teresinha dos Santos e Dra. Rosinéa Aparecida de Paula pela disponibilidade para a correção do trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos e pela consideração.

Aos colegas de laboratório pela convivência e pelos ensinamentos. Em especial, a Margarete e Ana Paula pela ajuda cotidiana e pela amizade que me trouxe grande alegria.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia de Anaeróbios e de Alimentos pela ajuda e amizade.

Aos amigos Fernanda, Laélia, Lívia, Patrícia, Natan e Marconi pela preciosa amizade.

Ao pessoal da república pela convivência, cafés e bate papo.

Aos amigos de Londrina pela amizade que guardarei comigo sempre.

## **BIOGRAFIA**

VANESSA DI RAIMO, filha de Rosino Di Raimo e Angela Nardone Di Raimo, nasceu em Marília, São Paulo no dia 01 de abril de 1985.

Em março de 2003 iniciou o curso de Biomedicina na Universidade Estadual de Londrina, Paraná, tornando-se bacharel em fevereiro de 2008.

Em março de 2008, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 20 de setembro de 2010.

## SUMÁRIO

|   |            |
|---|------------|
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                                      | <b>ix</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                      | <b>x</b>   |
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>xii</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>  | <b>xiv</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>1</b>   |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                              | <b>3</b>   |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                | <b>13</b>  |
| 3.1. Micro-organismos e condições de crescimento.....             | 13         |
| 3.2. Crescimento de <i>Staphylococcus</i> e <i>Listeria</i> ..... | 15         |
| 3.2.1. Crescimento em Caldo Nutritivo e caldo BHI a 37 °C.....    | 15         |
| 3.2.2. Crescimento em CN e BHI a 25 °C.....                       | 15         |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.3. Sobrevivência e inativação de <i>Staphylococcus</i> e <i>Listeria</i> em Caldo Salame (CS).....  | 15        |
| 3.4. Inibição de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. innocua</i> .....  | 16        |
| 3.5. Atividade antagonista em meio sólido.....  | 16        |
| 3.6. Análise da produção de ácido em Caldo Nutritivo por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho.....  | 17        |
| 3.7. Processamento do salame tipo italiano.....   | 17        |
| 3.8. Maturação do embutido.....   | 18        |
| 3.9. Determinações físico-químicas.....   | 19        |
| 3.10. Análises microbiológicas do salame.....   | 19        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>20</b> |
| 4.1. Crescimento de <i>Staphylococcus</i> spp. em Caldo Nutritivo a 37 °C em condições de aerobiose e microaerofilia e a 25 °C em condições de aerobiose..... | 20        |
| 4.2. Crescimento de <i>Listeria</i> spp. em caldo BHI a 37 °C e a 25 °C em condições de aerobiose.....  | 23        |
| 4.3. Sobrevivência e inativação de <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Listeria</i> spp. em Caldo Salame (CS).....  | 27        |
| 4.4. Atividade de inibição dos sobrenadantes das culturas de <i>Staphylococcus</i> spp. sobre <i>Listeria</i> spp.....  | 31        |
| 4.5. Atividade antagonista em meio sólido.....  | 31        |
| 4.6. Produção de ácidos orgânicos e etanol durante o crescimento de <i>Staphylococcus</i> spp. em Caldo Nutritivo.....  | 32        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.7. Crescimento e sobrevivência de <i>Staphylococcus</i> e <i>Listeria</i> em salame tipo italiano..... | 35        |
| <b>5. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>40</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>42</b> |

## LISTA DE TABELAS

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| <b>Tabela 1:</b> | Culturas bacterianas utilizadas neste estudo.....   | <b>14</b> |
| <b>Tabela 2:</b> | Micro-organismos utilizados na inoculação da massa do salame.....   | <b>18</b> |
| <b>Tabela 3:</b> | Atividade antimicrobiana de <i>Staphylococcus</i> spp. contra <i>Listeria</i> spp. determinada pelo método ágar “spot” .....  | <b>32</b> |
| <b>Tabela 4:</b> | Percentagens (g/L) dos tipos de ácidos e de etanol detectados nas amostras de sobrenadante de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativos analisados por HPLC referentes aos isolados provenientes de salame tipo italiano de fermentação natural..... | <b>34</b> |
| <b>Tabela 5:</b> | Contagens microbianas durante a fermentação e maturação do salame tipo italiano.....  | <b>37</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <b>Figura 1:</b> | Crescimento de <i>Staphylococcus</i> spp. em CN a 37 °C em aerobiose.....      | <b>21</b> |
| <b>Figura 2:</b> | Crescimento de <i>Staphylococcus</i> spp. em CN a 37 °C em microaerofilia..... | <b>22</b> |
| <b>Figura 3:</b> | Crescimento de <i>Staphylococcus</i> spp. em CN a 25 °C em aerobiose.....      | <b>24</b> |
| <b>Figura 4:</b> | Crescimento de <i>Listeria</i> spp. em BHI a 37 °C em aerobiose.....           | <b>25</b> |
| <b>Figura 5:</b> | Crescimento de <i>Listeria</i> spp. em BHI a 25 °C em aerobiose.....           | <b>26</b> |
| <b>Figura 6:</b> | Sobrevivência de <i>Staphylococcus</i> spp. em CS a 25 °C em aerobiose.....    | <b>29</b> |

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <b>Figura 7:</b> | Sobrevivência de <i>Listeria</i> spp. em CS a 25 °C em aerobiose.....                                      | <b>30</b> |
| <b>Figura 8:</b> | Variação do pH durante a fermentação e a maturação do salame tipo italiano nos diferentes tratamentos..... | <b>36</b> |

## RESUMO

DI RAIMO, Vanessa, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2010. **Atividade anti- *Listeria* de estafilococos coagulase negativos isolados de salame tipo italiano** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Co-orientadoras: Maria Cristina Dantas Vanetti e Regina Célia Santos Mendonça.

A utilização de micro-organismos como culturas *starter* pode contribuir para o desenvolvimento de novos produtos, para a melhoria da qualidade e da segurança dos produtos alimentícios. O objetivo deste estudo foi caracterizar isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos quanto à sua possível contribuição para segurança de produto cárneo fermentado. O crescimento de *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp. foi avaliado em caldo nutritivo e caldo BHI, respectivamente. A sobrevivência e inativação de *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp. foram avaliadas em um modelo laboratorial, caldo salame. A atividade de inibição de culturas de *Staphylococcus* spp. sobre *Listeria* spp. foi avaliada pelos métodos difusão em ágar e ágar "spot". A análise da produção de ácidos em amostras de sobrenadantes de *Staphylococcus* spp. foi feita por HPLC. Salame tipo italiano foi produzido e inoculado com cultura *starter*

comercial acrescida de  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> da cultura de *Staphylococcus pasteurii* BIS 26 e, ou  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> da cultura de *Listeria monocytogenes* IP1-23 ou *Listeria innocua* LMA 80. *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp. apresentaram maiores velocidades específicas de crescimento em aerobiose na temperatura de 37 °C. Os isolados de *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp. não se desenvolveram no caldo salame, nas condições testadas. Não foi observada inibição do sobrenadante das culturas de *Staphylococcus* spp. sobre *L. innocua* e *L. monocytogenes*, entretanto, no cultivo em superfície, as médias dos diâmetro dos halos de inibição variaram de 3 mm a 8 mm. Na análise por HPLC, o ácido láctico foi o detectado em maior concentração, com valores entre 0,2 e 0,4 % v/v. O pH final dos salames tipo italiano após 31 dias de maturação variou entre 4,8 e 5,3. Nos salames, a população de *L. monocytogenes* IP1-23 foi reduzida em cerca de 5 ciclos logarítmicos quando inoculada juntamente com a cultura *starter* comercial enquanto no tratamento em que a cultura de *S. pasteurii* BIS 26 foi adicionada a redução foi de cerca de 2 ciclos log. A diferença observada entre os tratamentos indica que *L. monocytogenes* IP1-23 foi mais sensível que *L. innocua* LMA 80. No entanto, os resultados de ensaios *in vitro* mostraram que nem sempre isto ocorre, e deve-se ter cautela ao utilizar *L. innocua* como um organismo indicador.

## ABSTRACT

DI RAIMO, Vanessa, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2010. **Antilisterial activity in coagulase negative staphylococci isolated from Italian type salami** Adviser: Célia Alencar de Moraes. Co-advisers: Maria Cristina Dantas Vanetti and Regina Célia Santos Mendonça.

The use of micro-organisms as starter cultures may help in developing new products as well as improving quality and safety of food products. The aim of this study was to characterize isolates of coagulase negative staphylococci regarding their contribution the safety of a fermented meat product. *Staphylococcus* spp. and *Listeria* spp. were grown in Nutritive Broth and BHI broth, respectively. Survival and inactivation of *Staphylococcus* spp. and *Listeria* spp. were evaluated in a laboratory model, Salami Broth. The inhibitory activity of cultures of *Staphylococcus* spp. on *Listeria* spp. was evaluated by agar diffusion assay and agar spot test. Acid production by *Staphylococcus* spp. was assessed by HPLC on culture supernatants. Italian salami was produced and inoculated with commercial starter culture and  $10^6$  CFU.g<sup>-1</sup> *S. pasteurii* BIS 26 and, or  $10^4$  CFU.g<sup>-1</sup> *L. monocytogenes* IP1-23 or *L. innocua* LMA 80. *Staphylococcus* spp. and *Listeria* spp. showed highest specific growth rates

under aerobic conditions at 37 ° C. *Staphylococcus* spp. and *Listeria* spp. did not developed in salami broth under test conditions. No inhibitory activity was observed in culture supernatants of *Staphylococcus* spp. on *Listeria* spp., however, when cultivation was carried out on agar surface the diameter of inhibition zones ranged from 3 mm to 8 mm. HPLC analysis showed that lactic acid was in higher concentration as compared to other organic acids, with values between 0.2 and 0.4 % v/v. The final pH of the Italian type salami after 31 days of ripening ranged from 4.8 to 5.3. In the salami, the population of *L. monocytogenes* IP1-23 was reduced by about 5 log cycles when inoculated with the commercial starter culture and 2 log cycles when *S. pasteurii* BIS 26 was added. The difference between treatments indicates that *L. monocytogenes* IP1-23 was more sensitive than *L. innocua* LMA 80. However, results of in vitro assays showed that this is not always the case, recommending caution when using *L. innocua* as an indicator organism.

## 1 INTRODUÇÃO

A fermentação do salame tradicional pode ocorrer de forma natural, quando é promovida por bactérias presentes na própria carne e as adquiridas durante o processamento, ou pela adição de micro-organismos que compõe as culturas *starter*. A cultura *starter* a ser utilizada depende da característica do produto final que se deseja obter como, a qualidade sensorial, a cor do produto, o odor ou a textura, além de contribuir para o controle microbiológico dos alimentos e para a diminuição do tempo de fermentação.

A indústria de alimentos tem interesse em padronizar as propriedades e a vida de prateleira dos seus produtos; melhorar os processos de controle microbiológico e as características que conferem o sabor a esses produtos, além de reduzir os custos de produção. Portanto, o estudo de micro-organismos para a composição de novas misturas de cultura *starter* é importante. A utilização dessas culturas pode contribuir para a formação de aromas, o desenvolvimento da cor do alimento, a produção de substâncias benéficas à saúde, de bacteriocinas ou outros antimicrobianos, além de qualidades probióticas e ausência de propriedades indesejáveis como a produção de aminas biogênicas e compostos tóxicos.

As culturas *starter* utilizadas na fermentação de salame geralmente pertencem ao grupo das bactérias do ácido láctico e dos estafilococos coagulase negativos. As bactérias do ácido láctico inibem micro-organismos

patogênicos principalmente pela sua capacidade de produção de ácido láctico, de ácido acético e possivelmente, de bacteriocinas. Os estafilococos coagulase negativos atuam no desenvolvimento e na estabilização da cor do produto curado, no aumento das propriedades sensoriais e limitam a oxidação de lipídeos, evitando a rancidez.

Neste trabalho, foram caracterizados oito isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos isolados de salame tipo italiano, produzido por fermentação natural, quanto à sua contribuição para segurança de produto cárneo fermentado. A aplicação dessas bactérias pode levar à obtenção de salames fermentados com melhor qualidade, ao mesmo tempo em que permite preservar as características originais do produto e garantir a segurança microbiológica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Produtos fermentados têm sido produzidos há milênios (CAPLICE e FITZGERALD, 1999; ROSS et al., 2002) resultando em uma grande variedade de produtos. A fermentação é um método comumente empregado com a finalidade de preservar, aumentar as propriedades sensoriais e a segurança microbiológica dos alimentos. Para a conservação de produtos cárneos, além da fermentação, outros métodos podem ser utilizados dentre eles a secagem, a salga, a cura e o cozimento (ESSID et al., 2007).

A fermentação do salame tradicional envolve bactérias da microbiota natural da carne e as adquiridas no ambiente de processamento. No entanto, podem ocorrer variações no número e na espécie de micro-organismos e consequentemente, alterações no produto final (LEROY et al., 2006). Muitos países possuem produtos cárneos tradicionais e desejam manter as suas características, porém a fermentação não controlada pode resultar em produtos com qualidade inferior ou até mesmo impróprios para o consumo (ESSID et al., 2007). Dependendo da atividade dos micro-organismos, podem ocorrer mudanças nas características nutricionais, no aroma, na textura e na segurança do produto (SIMONOVÁ et al., 2006).

A indústria de alimentos tem interesse em padronizar as propriedades e a vida de prateleira dos seus produtos; melhorar os processos de controle microbiológico e as características que conferem o sabor a esses produtos, além de reduzir os custos de produção (LÜCKE, 2000). Uma forma de melhorar e otimizar o processo de fermentação e obter produtos mais saborosos, saudáveis e seguros microbiologicamente é a seleção de micro-organismos que compõem as culturas *starter*. A utilização dessas culturas pode contribuir para a formação de aromas, o desenvolvimento da cor do alimento, a produção de substâncias benéficas à saúde, de bacteriocinas ou outros antimicrobianos, além de qualidades probióticas e ausência de propriedades indesejáveis como a produção de aminas biogênicas e compostos tóxicos (LEROY et al., 2006). O uso de culturas *starter* compostas de bactérias do ácido láctico e cocos Gram-positivos selecionados melhora a qualidade, a segurança e padroniza as características do produto final, além de contribuir para o desenvolvimento e manutenção da grande diversidade de produtos fermentados (LÜCKE, 2000).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento – MAPA (Regulamento técnico de identidade e qualidade do salame tipo italiano, Instrução Normativa nº. 22 de 31 de setembro de 2000) define-se salame tipo Italiano: “o produto cárneo industrializado, elaborado de carnes suínas ou suínas e bovinas, toucinho, adicionado de ingredientes, moídos em granulometria média entre 6 e 9 mm, embutido em envoltórios naturais ou artificiais, curado, defumado ou não, fermentado, maturado e dessecado por tempo indicado pelo processo de fabricação”. A presença de “mofos” característicos é consequência natural do seu processo tecnológico de fabricação. O baixo teor de umidade e a presença de ácido láctico conferem sabor característico o que o diferencia de outros embutidos (BRASIL, 2000).

O processamento dos embutidos fermentados normalmente requer três etapas principais: a formulação, a fermentação e a maturação/secagem, sendo que esses parâmetros tecnológicos variam de acordo com cada produtor (PEDERSON, 1979; BALDINI et al., 2000).

Na etapa de formulação e processamento, os ingredientes são preparados para serem embutidos. Uma mistura de carne magra e gordura, cloreto de sódio (NaCl), nitrato e/ ou nitrito (NaNO<sub>2</sub>/ NO<sub>2</sub>), açúcar (sacarose) e especiarias (principalmente orégano e pimenta preta) é homogeneizada, embutida, submetida à etapa de fermentação e, posteriormente de secagem

(HUGAS e MONFORT, 1997). Mudanças bioquímicas, microbiológicas, físicas e sensoriais que ocorrem durante a maturação do embutido cárneo nas condições definidas de temperatura e umidade relativa garantem a diversidade destes embutidos fermentados. Dentre essas mudanças destacam-se a diminuição do pH, mudanças na microbiota inicial, redução de nitrato a nitrito e de nitrito para óxido nítrico, formação de nitrosomioglobina, solubilização de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, proteólise, lipólise e ainda, oxidação e desidratação (CASABURI et al., 2007). Essas etapas garantem qualidades ao produto final tais como cor, aroma e firmeza, o que permite o corte do produto em fatias.

Os principais grupos de micro-organismos de interesse tecnológico isolados de fermentação natural de salames geralmente pertencem ao grupo das bactérias do ácido láctico e dos cocos Gram-positivos catalase positivos, representados principalmente pelos gêneros de *Staphylococcus* e *Kocuria* (CORBIERE MOROT-BIZOT et al., 2006). Dependendo do produto também são encontrados fungos, bactérias do gênero *Enterococcus* e leveduras (CASABURI et al., 2007). Bactérias do ácido láctico presentes em produtos cárneos fermentados inibem micro-organismos patogênicos principalmente pela sua capacidade de produção de ácido láctico, de ácido acético e possivelmente, de bacteriocinas (LÜCKE, 2000). *Staphylococcus* e *Kocuria* contribuem para o desenvolvimento da cor do produto pela redução de nitrato a nitrito e para a melhoria das propriedades sensoriais principalmente pela degradação de aminoácidos e inibição da oxidação de ácidos graxos insaturados (CASABURI, 2007).

Em carnes, a adição de micro-organismos desejáveis pode melhorar a segurança devido à inibição de patógenos; melhorar a estabilidade por inibir micro-organismos formadores e, conseqüentemente aumentar a vida de prateleira do produto (LÜCKE, 2000).

Os micro-organismos produtores de bacteriocinas podem ser usados no controle de patógenos (LEROY et al., 2006). Bacteriocinas são peptídeos sintetizados pelos ribossomos de bactérias e têm atividade antagonista a outras bactérias (COTTER et al., 2005). O mecanismo de ação das bacteriocinas varia entre as espécies bacterianas. A atividade antimicrobiana pode ser exercida com a formação de poros na membrana que gera despolarização na membrana citoplasmática e perda de metabólitos, tais como

aminoácidos, ATP e cátions, interrompendo os processos biossintéticos celulares (HÉCHARD e SAHL, 2002), com a inibição da síntese da parede celular por interação com lipídeo II e subsequente formação de poros na membrana (ASADUZZAMAN e SONOMOTO, 2009) e com moléculas alvos dos componentes do sistema manose fosfotransferase (DIEP et al., 2007).

As bacteriocinas têm potencial para serem utilizadas como bioconservantes em indústria de alimentos (JACK et al., 1995; COTTER et al., 2005; GILLOR et al., 2008). Muitas bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas inibem *Listeria*, porém são pouco efetivas contra *Bacillus*, *Clostridium* e *Staphylococcus*. Assim, torna-se necessária a busca por novas bacteriocinas efetivas contra patógenos e seguras para utilização em alimentos (LÜCKE 2000), que não causem toxicidade ou outro efeito adverso. Por outro lado, o fato de *Listeria* ser sensível a diversas bacteriocinas faz com que a aplicação destas em produtos passíveis de sustentar o crescimento desse patógeno seja um recurso atraente para a indústria alimentícia.

Até o presente, somente as bacteriocinas nisina e pediocina PA1/AcH foram aprovadas para o uso em alimentos (COTTER et al, 2005), no entanto, o uso de culturas bacteriocinogênicas em alimentos é permitido. No Brasil, em 1996, foi autorizado o uso da nisina como conservante em queijos na concentração máxima de 12,5 mg.kg<sup>-1</sup> (BRASIL, 1996). Em 1998, também foi autorizado pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal do MAPA, a utilização de uma preparação comercial de nisina, Nisaplin® (200 mg.kg<sup>-1</sup>. em solução de ácido fosfórico) na superfície externa de salsichas, pela publicação AUP/DOI/DIPOA n° 563/98.

Alguns estudos mostraram o uso de bactérias isoladas de salames fermentados produtoras de bacteriocinas (DE PAULA, 2005; XIPAPHI, 2008). Quando testada *in vitro*, por Xipaphi (2008), a bacteriocina de *Leuconostoc mesenteroides* E131 mostrou-se ativa contra *Listeria monocytogenes* nas condições de temperatura e de pH normalmente existentes em produtos cárneos fermentados. Portanto, seu uso como bioconservante em alimentos pode ser um fator que contribua para aumentar a segurança e aumentar a vida de prateleira de salames fermentados.

*L. monocytogenes* é uma bactéria patogênica Gram-positiva que causa infecções graves em humanos e animais e está presente em diversos ambientes como solo, água e produtos alimentares. A doença causada por

essa bactéria, listeriose, é adquirida por meio da ingestão de alimentos contaminados e afeta principalmente indivíduos imunodeprimidos, gestantes, idosos e recém-nascidos (FARBER e PETERKIN, 1991; GAHAN e COLLINS, 1991; HAMON et al., 2006). A dose infecciosa não é conhecida, no entanto, provavelmente é menor em indivíduos susceptíveis (SWAMINATHAN e GERNER-SMIDT, 2007).

Listeriose é uma doença esporádica, com taxa de morbidade baixa de 0,1-11,3 por milhão de habitantes (ANONYMOUS, 2004). A relevância dessa doença na saúde pública nem sempre foi reconhecida, porque a listeriose é uma doença relativamente rara em humanos quando comparada a outras doenças causadas pela ingestão de alimentos como, por exemplo, a salmonelose ou o botulismo. Porém, a alta taxa de mortalidade faz com que a listeriose ocupe o segundo lugar, depois da salmonelose, dentre as causas de morte mais frequentes provocadas em razão do consumo de alimentos (REBAGLIATI, 2009).

As manifestações da listeriose incluem gastroenterite, encefalite, meningite, infecções transmitidas congenitamente, septicemia, resultando em morte em 25 a 30 % dos casos. Essa diversidade de manifestações clínicas é resultado da capacidade de sobrevivência dessa bactéria na mucosa gástrica e intestinal e, posteriormente, da invasão do epitélio intestinal tornando possível o seu acesso aos órgãos internos (CHOWDHURY et al., 1996; HAMON et al., 2006). A capacidade das células de *Listeria* se adaptarem às condições de estresse presentes em alimentos, tais como calor, alta osmolaridade e baixo pH, é essencial para a sua virulência. Estímulos ambientais no fagossoma da célula hospedeira como o baixo pH, estresse oxidativo e a baixa concentração de  $Mg^{+2}$  desencadeiam a síntese de fatores de virulência essenciais durante a patogênese (DEIWICK et al., 1999; HEITHOFF et al., 1999).

A maioria dos casos de listeriose está associada ao consumo de produtos cárneos, pescados, vegetais crus e leite não pasteurizado. Alguns surtos foram relatados com alimentos refrigerados sem cozimento ou aquecimento antes do consumo como, por exemplo, diferentes tipos de queijos, salsichas, patês e sorvetes (ARTOLA e HERREJÓN, 2010).

O risco microbiológico causado pela presença de *Listeria* em produtos alimentícios é um problema importante e complexo, que pode resultar em grandes perdas econômicas para a indústria (THÉVENOT et al., 2005). O

controle de *L. monocytogenes* é difícil porque esta bactéria pode crescer em diferentes condições de temperatura e pH. Além disso, essa bactéria mantém a capacidade de crescimento em altas concentrações de NaCl e nitrito de sódio (ROCOURT et al., 2000), agentes comumente utilizados na indústria de produtos cárneos para garantir o controle de micro-organismos patogênicos, para aumentar a retenção de água, a coesão da carne, se ligar a gordura e preservar a cor do produto (VIGNOLO et al., 1998).

Produtos cárneos prontos para o consumo podem causar surtos de listeriose em humanos. Surtos relatados com esse grupo de alimento incluem: surto ocorrido no Reino Unido associado com o consumo de patê entre 1987-1999; surtos na França em 1992, 1993 e 1999 - 2000 e surtos em vários estados nos Estados Unidos em 1998 - 1999, 2000 e 2002 (SWAMINATHAN e GERNER-SMIDT, 2007). No Brasil, os surtos e/ou casos de listeriose são pouco relatados.

Há relatos da ocorrência de *Listeria* spp. em embutidos de carne fermentados (GUDBJORNSDOTTIR et al., 2004; SIRIKEN et al., 2006; BARROS et al., 2007; COLAK et al., 2007). Porém, mesmo não havendo muitos casos confirmados de listeriose associados ao consumo de produtos cárneos fermentados, a alta taxa de mortalidade (30 %) faz com que as autoridades de saúde se preocupem com o número de *L. monocytogenes* em produtos prontos para o consumo (HUGAS, 1995).

Goulet e colaboradores (2001) estudaram dados do monitoramento de alimentos obtidos pelo Ministério da Agricultura da França. Foram analisadas 5.809 amostras de produtos prontos para o consumo em 1993-1994 e 6.147 em 1995-1996 que se enquadravam dentro das quatro categorias (produtos cárneos, produtos lácteos, pescados e saladas preparadas). Os produtos cárneos (10,8 %) e pescados (10,4 %) eram mais susceptíveis a contaminação do que os produtos lácteos (4,7 %) e saladas preparadas (4,5 %). No entanto, os produtos lácteos eram contaminados frequentemente com números de *L. monocytogenes* mais elevados do que outros produtos, 1,8 % estavam contaminados, com  $\geq 100$  UFC.g<sup>-1</sup> em comparação com 0,3, 0,5 e 1,1 % de saladas, pescados e produtos cárneos, respectivamente.

Alguns países estabeleceram critérios e recomendações em relação aos números toleráveis de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo. Os EUA exigem “zero de tolerância”, ou seja, ausência de

*L. monocytogenes* em 25 g do alimento (SHANK et al. 1996). O Canadá e a França possuem uma política de tolerância de abaixo de 100 UFC.g<sup>-1</sup> em alguns alimentos (a probabilidade de doença é muito baixa em alimentos com concentração abaixo de 100 UFC.g<sup>-1</sup>) e zero de tolerância em alimentos que suportam o crescimento desse micro-organismo e para alimentos que possuem uma vida de prateleira maior (AFSSA, 2001). A Comissão do Codex Alimentarius recomenda ausência de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo (WHO, 2010). O Brasil exige ausência de *L. monocytogenes* em 25 g em produtos lácteos (BRASIL, 2001).

Mecanismos de controle de micro-organismos patogênicos como *L. monocytogenes* têm sido estudados. Albano e colaboradores., 2007 avaliou *in situ* o efeito da atividade anti- *Listeria* de bactérias do ácido láctico isoladas de salame português tradicional *in situ*. O crescimento de *L. innocua*, utilizada como modelo do comportamento de *L. monocytogenes*, foi inibido em pasta de salame quando co-inoculado com bactérias do ácido láctico, em comparação com o crescimento observado quando co-inoculada com uma bactéria não produtora de bacteriocina.

A aplicação de formulações de culturas *starter* isoladas de produtos lácteos na produção de salame Nostrano inibiu o crescimento e a sobrevivência de *L. monocytogenes*, aumentou as propriedades sensoriais desejáveis e ao mesmo tempo, manteve o pH na faixa adequada para este tipo de produto (CENCI-GOGA, 2008).

*Staphylococcus* podem ser utilizados como culturas *starter*, essas bactérias são cocos Gram-positivos, que formam arranjos em cachos de uva, aeróbios ou anaeróbios facultativos, exigentes nutricionalmente e catalase positivos (BERGEY e HOLT, 1994).

Estafilococos coagulase negativos são frequentemente encontradas no ambiente e em produtos alimentares, como parte da microbiota natural (IRLINGER, 2008). Em salames fermentados essas espécies são comumente isoladas (MONTEL et al., 1992; COPPOLA et al., 1997; MACIEL, 1998; MAURIELLO et al., 2004; OLIVEIRA, 2006) sendo que, *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. saprophyticus* são as mais utilizadas comercialmente como culturas *starter* no processamento de embutidos secos fermentados (MARTIN et al., 2007; MAURIELLO et al., 2004). Essas espécies possuem várias vantagens tecnológicas e são importantes no processamento deste produto,

pois garantem a formação do aroma e diminuem o desenvolvimento da rancidez (BECK et al., 2004; OLESEN et al., 2004; GEISEN et al., 1992), possuem atividades de nitrato redutase, nitrito redutase, catalase e consumo de oxigênio, o que aumenta a estabilidade da cor (GEISEN et al., 1992).

Culturas *starter* de cocos Gram-positivos coagulase negativos são consideradas como seguras quando não produzem enterotoxinas e aminas biogênicas. Além disso, podem contribuir para a segurança do produto quando apresentam atividade de antagonismo a patógenos e de degradação de aminas biogênicas (OLIVEIRA, 2006).

A formação da cor e a estabilidade são qualidades importantes atribuídas aos produtos fermentados de carne, principalmente em fatiados porque estes produtos são frequentemente comercializados em embalagens que os deixam susceptíveis à oxidação devido à extensão da superfície de contato com o oxigênio e a luz nas condições de comercialização (MOLLER e SKIBSTED, 2002). A atividade de nitrato redutase de *Staphylococcus coagulase negativos* é importante na formação da cor característica e na estabilidade desejável em produtos cárneos fermentados, pois permite a formação de nitrosomioglobina (MbFeIIINO), pigmento responsável pela cor (TALON et al., 1999; MOLLER e SKIBSTED, 2002). As reações químicas que garantem a formação do pigmento constituem uma série de processos, catalisados microbiologicamente, enzimaticamente e/ou quimicamente, os quais dependem do pH, da concentração do pigmento, do potencial redox, da distribuição dos agentes de cura, da temperatura e da umidade relativa (CHASCO et al., 1996). Além disso, a redução do nitrato a nitrito limita a oxidação dos lipídeos por se ligar ao grupamento heme e impedir a liberação de ferro catalítico; por se ligar ao grupamento não-heme de ferro e inibir a catálise; e/ou por estabilizar lipídeos contra a oxidação (TALON et al., 1999).

A atividade de catalase e superóxido dismutase nessas bactérias é importante na decomposição do peróxido de hidrogênio impedindo a oxidação lipídica (BARRIÈRE et al., 2001).

Várias substâncias aromáticas e ácidos orgânicos são liberados por meio da atividade de lipases e proteases de *Staphylococcus coagulase negativos* o que contribui para o desenvolvimento do aroma em produtos cárneos fermentados devido a formação de compostos de baixo peso

molecular, incluindo peptídeos, aminoácidos, aldeídos, aminas e ácidos graxos livres (SIMONOVÀ et al., 2006).

Diversos fatores devem ser considerados na escolha da cultura *starter* produtora de bacteriocina para a fermentação da carne, como a capacidade de crescimento e produção de bacteriocina *in situ*, a difusão da bacteriocina na carne (DICKS et al., 2004) e sua ligação nos componentes do alimento (proteínas e gorduras) (AESEN et al., 2003), a influência de ingredientes específicos da carne (NaCl e NO<sub>2</sub>) (VERLUYTEN et al., 2003), condições como degradação proteolítica e a perda de estabilidade da atividade da bacteriocina (SANTINOPOULOS et al., 2002).

O efeito antimicrobiano de culturas com potencial para serem utilizadas em culturas *starter* foi observado em alguns estudos. No estudo de Essid e colaboradores (2007) foi observada a atividade antibacteriana de *S. xylosus* isolados de carnes salgadas tradicionais da Tunísia contra *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, *S. aureus*, *Pseudomonas aruginosa*, *E. coli* e *Enterococcus faecalis*. Lauková e colaboradores (2010) utilizaram *S. xylosus* SX S03/1M/1/2 na fabricação de salames secos fermentados e monitoraram sua sobrevivência e capacidade protetora. A atividade bacteriocinogênica foi de 800-1600 AU.mL<sup>-1</sup> nos valores de pH entre 5,0 e 7,0 e essa substância não perdeu atividade depois do tratamento térmico.

As culturas *starter* comerciais nem sempre são capazes de competir com a microbiota residente e, isto resulta em perdas das propriedades sensoriais desejáveis no produto. Portanto, culturas *starter* apropriadas devem ser selecionadas a partir do próprio alimento, sendo assim bem adaptadas ao ambiente da carne e mais competitivas devido as suas capacidades metabólicas específicas (LEROY et al., 2006).

Oliveira (2006) caracterizou noventa e oito estirpes de bactérias Gram-positivas, em sua maioria estafilococos coagulase negativos, provenientes de salame tipo italiano produzidos por fermentação artesanal e por fermentação industrial, quanto a aspectos relacionados ao seu uso em culturas *starter*. Cinquenta e um isolados apresentaram atividade antagonista contra *L. monocytogenes*, dos quais 27 com ação por substância de natureza protéica. Trinta e sete isolados demonstraram atividade antagonista contra *S. aureus*, dos quais 30 com ação por substância de natureza protéica. Dezesesseis estirpes de estafilococos, pertencentes às espécies *S. capitis* subsp. *capitis*,

*S. caprae*, *S. arlettae* e *S. delphini*, demonstraram ação antagonista *in vitro* por substância de natureza protéica sobre ambas as bactérias indicadoras. Todas as estirpes exibiram atividade de catalase, destas várias exibiram elevadas atividades de nitrato redutase. Observou-se uma baixa incidência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas. Poucos isolados foram capazes de produzir níveis relevantes de aminas biogênicas, mas um grande número foi capaz de degradar histamina e/ou tiramina.

Pesquisas que visam selecionar estirpes adequadas para utilização como cultura *starter* são úteis no desenvolvimento de novos produtos ou na melhoria da qualidade dos produtos alimentícios. Neste estudo explora-se o potencial antilisteria de alguns isolados com características comprovadas de segurança e funcionalidade.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia (DMB/UFV) e no Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA/UFV) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

#### 3.1 Micro-organismos e condições de crescimento

As culturas de *Staphylococcus* spp. utilizadas neste estudo foram isoladas a partir de salames tipo italiano processados por fermentação natural (TRISTÃO, 1998), caracterizados bioquimicamente (OLIVEIRA, 2006) e, a partir dessa caracterização, as que não exibiam genes codificadores de enterotoxinas e não produziam aminas biogênicas foram selecionadas. As culturas de *Listeria* spp. foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia (DMB/UFV) (Tabela 1).

Todas as culturas de *Staphylococcus* spp. foram mantidas em meio Caldo Nutritivo (CN) (OLIVEIRA, 2006) e de *Listeria* spp. em meio Infusão de

Cérebro e Coração (BHI) a -80 °C, acrescidas de 20 % de glicerol. Antes de cada experimento, as culturas foram ativadas nos respectivos meios e incubadas a 37 °C por 16 horas.

Para o processamento do salame tipo Italiano a cultura *starter* de *Lactobacillus* e *Pediococcus* (Bactoferm SM-199), gentilmente cedida pela empresa Christian Hansen na forma liofilizada, foi utilizada de acordo com as recomendações do fabricante.

**Tabela 1.** Culturas bacterianas utilizadas neste estudo.

| <b>Espécie/ Estirpe</b>        | <b>Origem</b>        | <b>Sorogrupo</b> | <b>Local</b>               |
|--------------------------------|----------------------|------------------|----------------------------|
| <b><i>S. epidermidis</i></b>   |                      |                  |                            |
| BIS <sup>1</sup> 25            | Salame tipo italiano |                  | UFV                        |
| BIS 31                         | Salame tipo italiano |                  | UFV                        |
| BIS 32                         | Salame tipo italiano |                  | UFV                        |
| <b><i>S. pasteurii</i></b>     |                      |                  |                            |
| BIS 26                         | Salame tipo italiano |                  | UFV                        |
| BIS 34                         | Salame tipo italiano |                  | UFV                        |
| CIS <sup>2</sup> 45            | Salame tipo italiano |                  | UFV                        |
| CIS 53                         | Salame tipo italiano |                  | UFV                        |
| <b><i>S. saprophyticus</i></b> |                      |                  |                            |
| CIS 46                         | Salame tipo italiano |                  | UFV                        |
| <b><i>L. monocytogenes</i></b> |                      |                  |                            |
| ATCC <sup>3</sup> 7644         |                      | 4b               |                            |
| SCOTT A                        |                      | 4b               |                            |
| IP1-23                         | Salame               |                  | EMBRAPA <sup>4</sup> /CTAA |
| IP1-26                         | Salame               |                  | EMBRAPA/CTAA               |
| <b><i>L. innocua</i></b>       |                      |                  |                            |
| LMA <sup>5</sup> 80            |                      |                  | Indústria de Laticínios    |
| LMA 95                         |                      |                  | Indústria de Laticínios    |
| LMA 98                         |                      |                  | Indústria de Laticínios    |
| CERELA <sup>6</sup>            |                      |                  | CERELA                     |

<sup>1</sup>BIS, <sup>2</sup>CIS = Identificação original segundo TRISTAO, 1998.

<sup>3</sup>ATCC = *American Type Culture Collection*

<sup>4</sup>EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

<sup>5</sup>LMA = Laboratório de Microbiologia de Alimentos/ Departamento de Microbiologia - UFV

<sup>6</sup>CERELA = Centro de Referência para *Lactobacillus*

## **3.2 Crescimento de *Staphylococcus* e *Listeria***

### **3.2.1 Crescimento em Caldo Nutritivo e caldo BHI a 37 °C**

As culturas de *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp. ativadas, foram padronizadas para atingirem D.O.<sub>600 nm</sub> de 0,4 em espectrofotômetro (Milton Roy Spectronic 20 D) e inoculadas em CN e BHI respectivamente, em triplicata, em placas de microtitulação, contendo em cada microcompartimento 297 µL do respectivo meio. Foi adicionado o inóculo de 3 µL contendo o mesmo meio com 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. O crescimento a 37 °C foi acompanhado em leitor de ELISA (PowerWave XS, BioTek) até a fase estacionária. Os isolados de *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp. foram estudados em condição de aerobiose porém, somente os isolados de *Staphylococcus* spp. foram estudados em condições de microaerofilia obtidas em dessecadores com vela.

### **3.2.2 Crescimento em CN e BHI a 25 °C**

As culturas de *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp. ativadas, foram padronizadas para atingirem D.O.<sub>600 nm</sub> de 0,4 e inoculadas em 9,8 mL de CN e BHI, a 2% v/v, respectivamente. O crescimento foi acompanhado nos tempos 0, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de incubação. Diluições decimais sucessivas foram feitas utilizando solução salina a 0,85 % e, em seguida, microgotas (20 µl) de cada diluição foram plaqueadas em triplicata nos respectivos meios de cultivo e incubadas a 37 °C por 24 horas para a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>).

## **3.3 Sobrevivência e inativação de *Staphylococcus* e *Listeria* em Caldo Salame (CS)**

*Staphylococcus* e *Listeria* foram cultivados durante 16 horas a 37 °C em CN e BHI, respectivamente e após esse período, foram novamente cultivados nos respectivos meios a 25 °C. Posteriormente, foram adicionados 2 % do inóculo de cada isolados em CS formulado com os seguintes componentes: 1 % de glicose, 2 % de NaCl, 20 % de extrato de carne, NaNO<sub>2</sub> 150 mg.kg<sup>-1</sup> e ácido ascórbico 540 mg.kg<sup>-1</sup>. O pH do meio foi corrigido para pH

4,8 utilizando ácido láctico. Após incubação a 25 °C, amostras foram retiradas em 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 horas, no sétimo e no décimo quarto dia, diluídas, plaqueadas por microgotas (20 µL) nos respectivos meios de cultivo e incubadas por 24 horas para a contagem das UFC.mL<sup>-1</sup>. Em todos os tempos de amostragem, foi feita a coloração de Gram para verificar a morfologia e o arranjo das células.

### **3.4 Inibição *L. monocytogenes* e *L. innocua***

Para realizar o teste de inibição, amostras do sobrenadante dos isolados de *Staphylococcus* spp. incubados por 18 horas em CN foram submetidas a diferentes tratamentos. No primeiro tratamento, o pH das amostras do sobrenadante não foi ajustado, no segundo as amostras do sobrenadante foram neutralizadas previamente e no terceiro tratamento, o pH da cultura foi ajustado para 2,5 e, após a coleta do sobrenadante, o pH foi neutralizado antes de ser testado.

Após o preparo das amostras, a atividade de inibição do sobrenadante de cada isolado de *Staphylococcus* spp. sobre as espécies de *Listeria* spp. foi avaliada pelo método de difusão em ágar conforme descrito por De Paula (2005), em que 25 µL da amostra do sobrenadante foram adicionados em orifícios (5 mm) feitos em placas contendo 20 mL de meio de cultura sólido inoculado com, aproximadamente, 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> de cada espécie de *Listeria*. As placas foram mantidas a 4 °C por 12 horas para difusão e posteriormente incubadas em condições ótimas para o crescimento de *Listeria* spp. Após 24 horas de incubação, o diâmetro dos halos de inibição foi medido e apresentado como a medida do diâmetro externo do halo de inibição subtraído do diâmetro do orifício. O experimento foi feito em triplicata.

### **3.5 Atividade antagonista em meio sólido**

A atividade antagonista dos oito isolados de *Staphylococcus* spp. a *Listeria* spp. foi determinada pelo método ágar “spot” descrito por Spelhaug e Harlander (1989). Os isolados foram cultivados por 24 horas em CN. As culturas foram diluídas em CN e padronizadas para D.O.<sub>600 nm</sub> = 0,4. Foram feitas microgotas de 5 µL, em duplicatas, na superfície de ágar nutritivo em

placas de Petri. Após a incubação a 37 °C por 24 horas, 300 µL das culturas indicadoras de *Listeria* spp., previamente cultivadas em CN a 37 °C por 18 horas, foram adicionadas em 10 mL de ágar nutritivo semi-sólido e vertidos sobre as placas contendo as microgotas. Estas foram novamente incubadas a 37 °C por 18 horas e os halos de inibição foram medidos como a distância da borda da colônia até a borda do halo. Medidas inferiores a 1,5 mm foram consideradas como ausência de inibição.

### **3.6 Análise da produção de ácido em caldo nutritivo por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho**

*Staphylococcus* spp. foram cultivados por 24 horas em CN. Alíquotas de 1 mL coletadas do meio de cultivo, foram preparadas por quatro etapas de centrifugação a 7826 g por 10 minutos em Microcentrífuga Sigma 2k15 refrigerada (Long Island Scientific, Port Jefferson, USA) e congeladas a -20 °C até seu uso. A seguir, foram analisadas em cromatógrafo Ultimate 3000 Dual (DIONEX), em coluna PHENOMENEX® Rezex ROA 300×7,8 mm, utilizando como fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 M, temperatura de operação de 40 °C e fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, com detector de índice de refração (Shodex RI-101). Foram utilizados como padrões glicose, succinato, lactato, formato, acetato, 2,3-butanodiol e etanol. As médias foram comparadas pelo teste de agrupamento de Scott- Knott a 5 % de probabilidade.

### **3.7 Processamento do salame tipo italiano**

O salame tipo italiano foi processado no Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA/UFV). Para a fabricação do embutido, foi obedecida a seguinte formulação: 60 % de carne suína (pernil dianteiro magro) congelada e 40 % de toucinho congelado. Em relação à massa cárnea, foram utilizados os seguintes ingredientes não cárneos: 2 % de NaCl, 2 % de glicose, 150 ppm de NaNO<sub>2</sub>, 540 ppm de ácido ascórbico, 0,3 % de alho em pó e 0,1 % de pimenta calabresa.

A carne suína foi moída em moedor de bancada, tipo açougue (Skywsem), com discos de 8 mm de diâmetro por duas vezes consecutivas e o toucinho foi moído uma vez em discos tipo AB 5F, de 32 mm de diâmetro. A

carne e o toucinho foram misturados por alguns minutos e, em seguida, foram adicionados os ingredientes não cárneos, misturando-se por, aproximadamente, três minutos, para obter uma massa homogênea.

Os tratamentos realizados no experimento estão listados na tabela 2.

**Tabela 2.** Micro-organismos utilizados na inoculação da massa do salame.

| Tratamento | Micro- organismo   |
|------------|--|
| A          | Bactoferm SM-199,  |
| B          | Bactoferm SM-199, <i>S. pasteurii</i> BIS 26                                 |
| C          | Bactoferm SM-199, <i>S. pasteurii</i> BIS 26, <i>L. monocytogenes</i> IP1-23 |
| D          | Bactoferm SM-199, <i>S. pasteurii</i> BIS 26, <i>L. innocua</i> LMA 80       |
| E          | Bactoferm SM-199, <i>L. monocytogenes</i> IP1-23                             |
| F          | Bactoferm SM-199, <i>L. innocua</i> LMA 80                                   |

Antes da inoculação da massa do salame com os micro-organismos, amostras de 25 g foram coletadas para detecção de *Listeria* sp. na massa do salame e analisadas conforme metodologia ISO (ISO 11290-1: 1998). Em todos os tratamentos foi feita a adição de cerca de  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> da cultura Bactoferm SM-199 liofilizada e, de acordo com cada tratamento foi adicionado cerca de  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> da cultura de *S. pasteurii* BIS 26 e/ou de cerca de  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> da cultura de *L. monocytogenes* IP1-23 ou de *L. innocua* LMA 80 à massa. Foi feita uma nova mistura, por dois minutos, para assegurar uma boa distribuição dos ingredientes e do inóculo. Posteriormente, foi feito o embutimento da massa em tripa artificial de celulose de 4,5 cm de diâmetro. O próprio moedor da carne acoplado com um funil de aço na extremidade de saída da carne moída foi utilizado para embutir o produto. Em cada tratamento, após o embutimento, o equipamento foi esterilizado com vapor de baixa temperatura e hipoclorito de sódio, por 15 minutos. Foram produzidos embutidos de, aproximadamente, 400 gramas e todos os tratamentos foram conduzidos em duplicata.

### 3.8 Maturação do embutido

O embutido produzido foi mantido por cinco dias em câmara incubadora B.O.D., modelo MA 415 (MARCONI) à temperatura de 25 °C e 80 e 90 % de

umidade relativa (UR) para que ocorresse a etapa de fermentação. A partir do 5º dia a temperatura foi gradativamente reduzida para 15 °C e a umidade foi controlada para 70 a 75 %. A maturação foi completada em 26 dias. A umidade do ambiente foi medida e controlada com NaCl e CaOH.

### **3.9 Determinações físico-químicas**

As análises de pH foram feitas imediatamente após a fabricação do embutido, aos cinco dias após o processamento, e nos dias 15 e 31, e consistiam de duas unidades do produto. O pH do embutido foi determinado utilizando-se pHmetro Denver Instrument UB-10 (Ultra Basic).

### **3.10 Análises microbiológicas do salame**

A sobrevivência de *L. monocytogenes* e *L. innocua* foi acompanhada durante a fermentação e a maturação dos salames. As coletas das amostras para avaliar a população de *L. monocytogenes* e *L. innocua* no produto foram feitas após a fabricação do embutido, dia inicial, após o término da fermentação, cinco dias, e durante a maturação, 15 e 31 dias, e consistiam de duas unidades do produto. Porções de 25 gramas do produto foram pesadas assepticamente e homogeneizadas em “stomacher” Seward BA 7021, com 225 mL de água peptonada tamponada 0,1 %. A contagem de *Listeria* spp. foi feita em ágar ALOA (HIMEDIA), a 35 °C ± 2 °C, após 48 horas de incubação. A contagem de *Staphylococcus* foi feita em ágar Baird Parker (HIMEDIA), a 35 °C ± 2 °C, após 48 horas de incubação. A contagem de bactérias lácticas foi feita em ágar MRS, a 25 °C ± 2 °C em jarras com sachês de anaerobiose, após 72 horas de incubação.

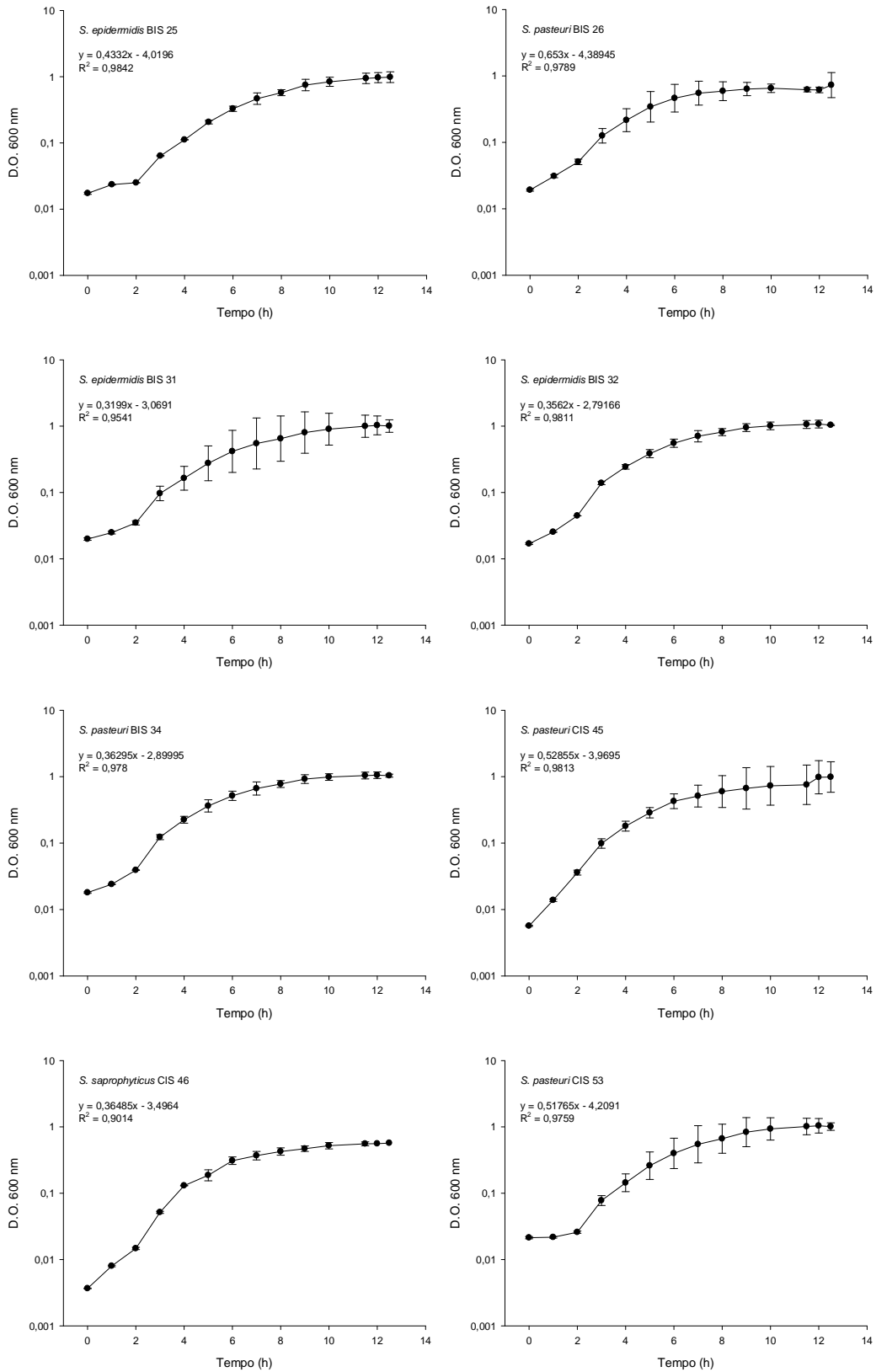
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Crescimento de *Staphylococcus* spp. em Caldo Nutritivo a 37 °C em condições de aerobiose e microaerofilia e a 25 °C em condições de aerobiose

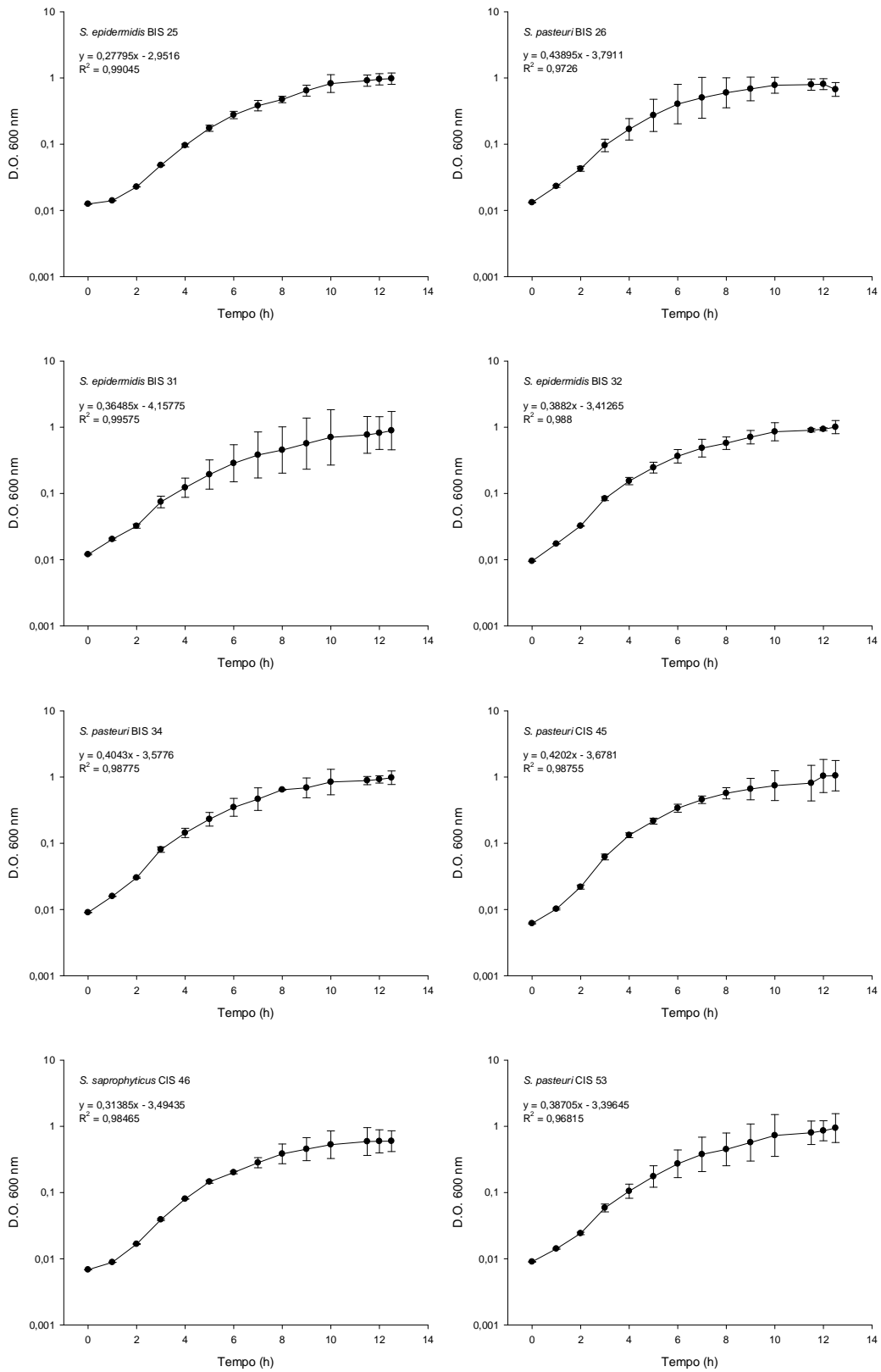
As Figuras 1 e 2 mostram o crescimento dos isolados de *Staphylococcus* spp. em CN a 37 °C em condições de aerobiose e microaerofilia, respectivamente.

Quando os isolados de *Staphylococcus* spp. foram cultivados em aerobiose, a velocidade específica de crescimento variou entre 0,31 h<sup>-1</sup> e 0,65 h<sup>-1</sup>. O isolado que apresentou maior velocidade específica de crescimento foi *S. pasteurii* BIS 26, 0,65 h<sup>-1</sup>. Quando os mesmos isolados foram cultivados em microaerofilia, a velocidade específica de crescimento variou entre 0,27 h<sup>-1</sup> e 0,44 h<sup>-1</sup>. Também nestas condições, o isolado BIS 26 apresentou velocidade específica maior, que foi de 0,44 h<sup>-1</sup>.

*Staphylococcus* são micro-organismos anaeróbios facultativos que podem crescer em temperaturas de 18 a 40 °C. Possuem um crescimento mais



**Figura 1.** Crescimento de *Staphylococcus* spp. em CN a 37 °C em aerobiose.



**Figura 2.** Crescimento de *Staphylococcus* spp. em CN a 37 °C em microaerofilia.

rápido e abundante em aerobiose, com exceção a espécie anaeróbia *S. saccharolyticus* (BERGEY e HOLT, 1994). Nossos resultados foram condizentes com a literatura, pois em condições de aerobiose os isolados de *Staphylococcus* spp. apresentaram uma velocidade específica maior do que quando comparados em condições de microaerofilia. O crescimento desses micro-organismos em microaerofilia é desejável, pois esta condição prevalece no interior do salame (PEDERSON, 1979).

Para verificar o efeito da temperatura utilizada durante a fermentação sobre o crescimento, os isolados de *Staphylococcus* spp. foram cultivados a 25 °C em condições de aerobiose (Figura 3).

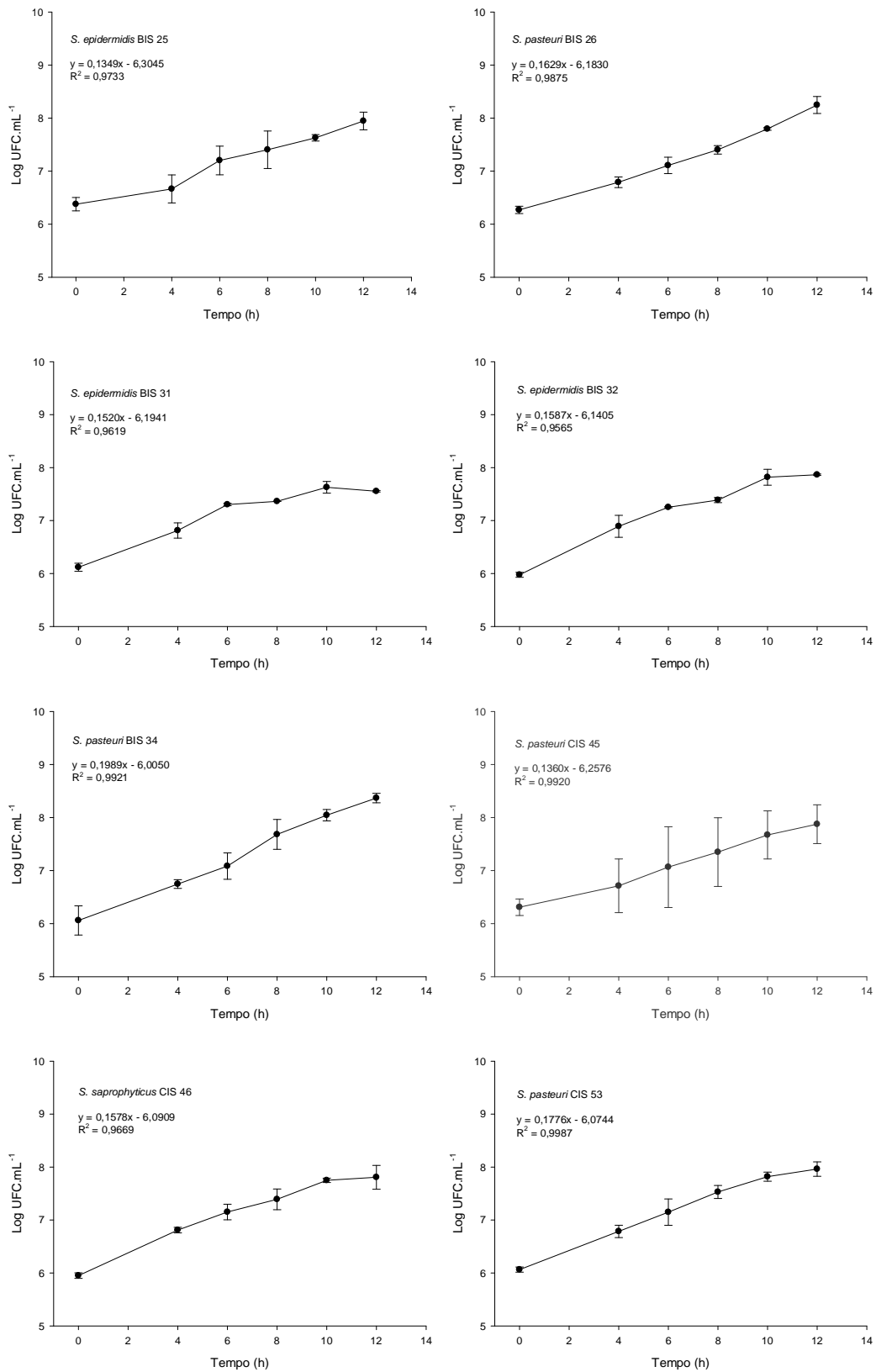
Quando os isolados foram cultivados na temperatura de 25 °C a velocidade específica de crescimento variou entre 0,13 h<sup>-1</sup> e 0,20 h<sup>-1</sup>. O isolado *S. pasteurii* BIS 34 apresentou velocidade específica maior de 0,20 h<sup>-1</sup>.

Em condições de aerobiose, os isolados de *Staphylococcus* spp. apresentaram em geral, uma velocidade específica de crescimento maior quando cultivados a temperatura de 37 °C (Figura 1) do que quando cultivados a 25 °C (Figura 3). Um crescimento mais abundante de *Staphylococcus* spp. na temperatura de 37 °C é justificável em razão da natureza mesófila desses micro-organismos (BERGEY e HOLT, 1994). Estudos prévios são necessários para avaliar o potencial de crescimento dos micro-organismos nas condições que simulem os processos empregados durante a fermentação do salame visto que, o número de micro-organismos adicionados depende do potencial de crescimento destes no produto (LÜCKE, 2000).

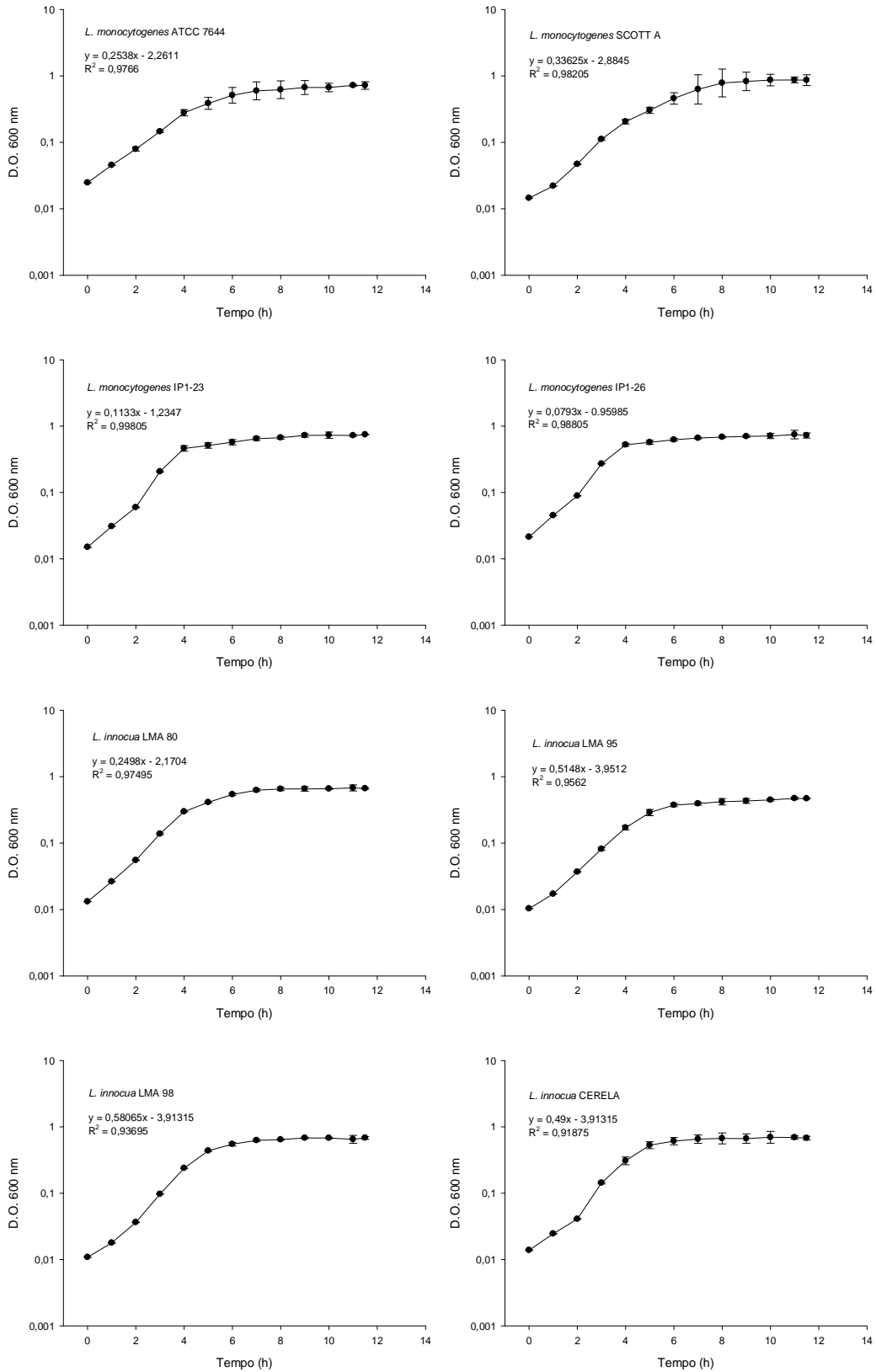
#### **4.2 Crescimento de *Listeria* spp. em caldo BHI a 37 °C e a 25 °C em condições de aerobiose**

Quando os isolados de *Listeria* spp. foram cultivados em BHI a 37 °C em aerobiose (Figura 4), a velocidade específica de crescimento variou entre 0,07 h<sup>-1</sup> e 0,58 h<sup>-1</sup>. O isolado *L. innocua* LMA 98 apresentou velocidade específica maior de 0,58 h<sup>-1</sup>.

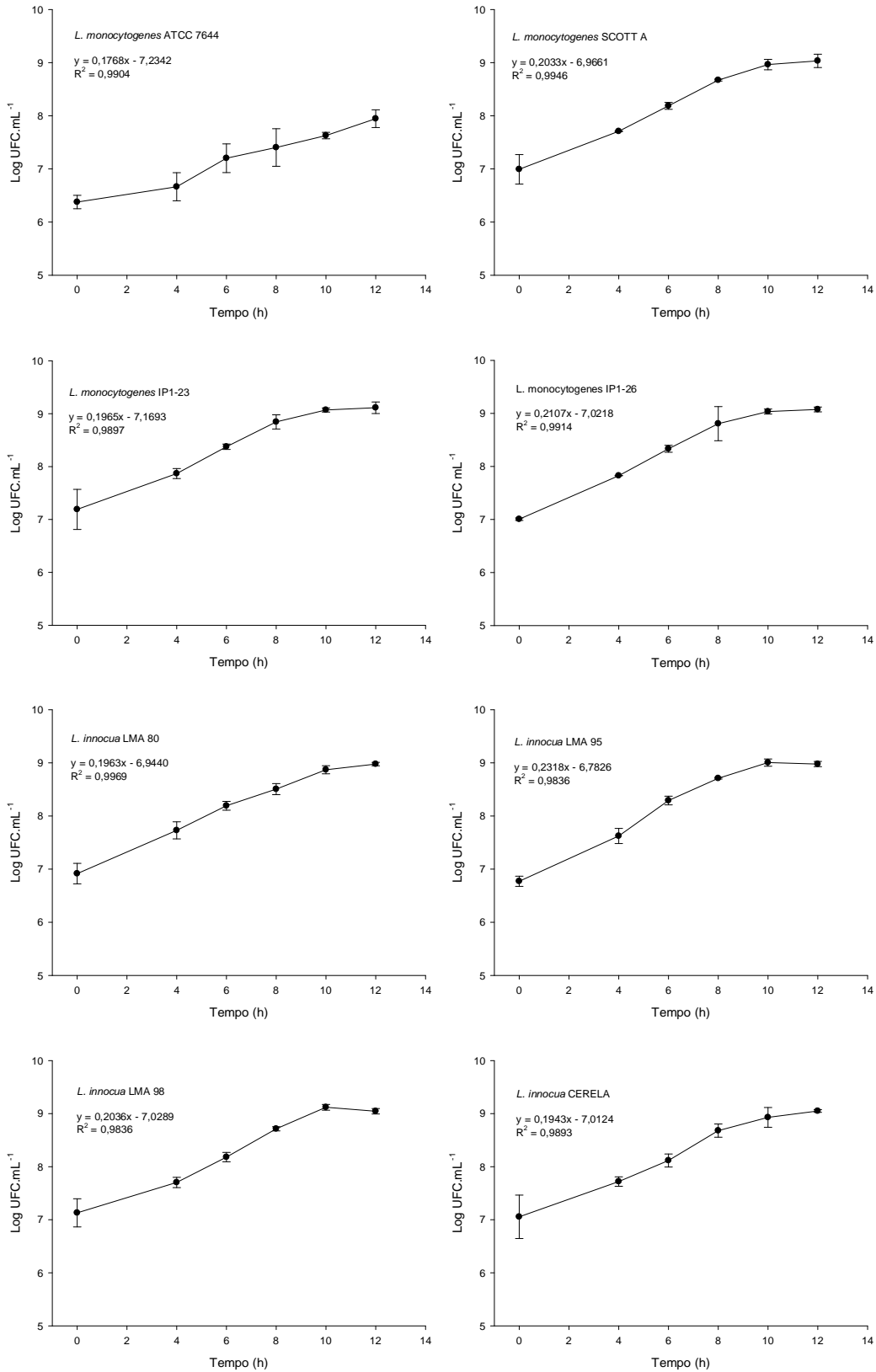
A velocidade específica de crescimento dos isolados de *Listeria* spp. cultivados a 25 °C em condições de aerobiose (Figura 5) variou entre 0,18 h<sup>-1</sup> e 0,23 h<sup>-1</sup>. O isolado *L. innocua* LMA 95 apresentou velocidade específica maior de 0,23 h<sup>-1</sup>.



**Figura 3.** Crescimento de *Staphylococcus* spp. em CN a 25 °C em aerobiose.



**Figura 4.** Crescimento de *Listeria* spp. em BHI a 37 °C em aerobiose.



**Figura 5.** Crescimento de *Listeria* spp. em BHI a 25 °C em aerobiose.

Os isolados de *Listeria* spp. apresentaram um crescimento mais lento na temperatura de 25 °C em relação a temperatura de 37 °C. *L. monocytogenes* apresenta um crescimento ótimo entre 30 e 37 °C, porém pode crescer no intervalo de temperatura entre + 4 e 45 °C (AFSSA, 2000).

#### **4.3 Sobrevivência e inativação de *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp. em Caldo Salame (CS)**

O caldo salame foi um modelo laboratorial utilizado neste estudo para simular as condições do salame *in situ*.

Nas condições que simulam a composição de salame tipo italiano os isolados de *Staphylococcus* spp. estudados não se desenvolveram e apresentaram cinética de inativação distintas (Figura 6). Os isolados de *S. epidermidis* BIS 25 e de *S. saprophyticus* CIS 46 apresentaram cinética de inativação similar entre si. Os isolados de *S. pasteurii* BIS 26, BIS 34, CIS 45 e CIS 53 e de *S. epidermidis* BIS 31 e BIS 32 também apresentaram cinética de inativação similar, entretanto o isolado BIS 31 resistiu por tempo menor nas condições estudadas.

Embora, a maioria das espécies de *Staphylococcus* apresentem crescimento na presença de 10 % NaCl e em temperaturas que variam de 18 a 40 °C (BERGEY e HOLT, 1994), o modelo utilizado neste trabalho não foi capaz de permitir o crescimento dos isolados de *Staphylococcus* estudados. Micro-organismos isolados de produtos cárneos fermentados naturalmente são mais adaptados às condições encontradas no salame (DROSINOS et al. 2005). Nas condições programadas para simular o salame *in situ*, os micro-organismos estudados não apresentaram essa característica. Essas bactérias foram, no entanto, isoladas de salame tipo italiano produzidos por fermentação natural (TRISTÃO, 1998). O não crescimento pode ter sido devido o pH inicial do meio, bem mais baixo que o pH inicial da preparação da carne para o processamento do salame. O ajuste do pH foi feito para simular a presença de bactérias lácticas presentes em culturas *starter*. Essas bactérias acidificam o meio paulatinamente, enquanto no CS o ajuste foi imediato.

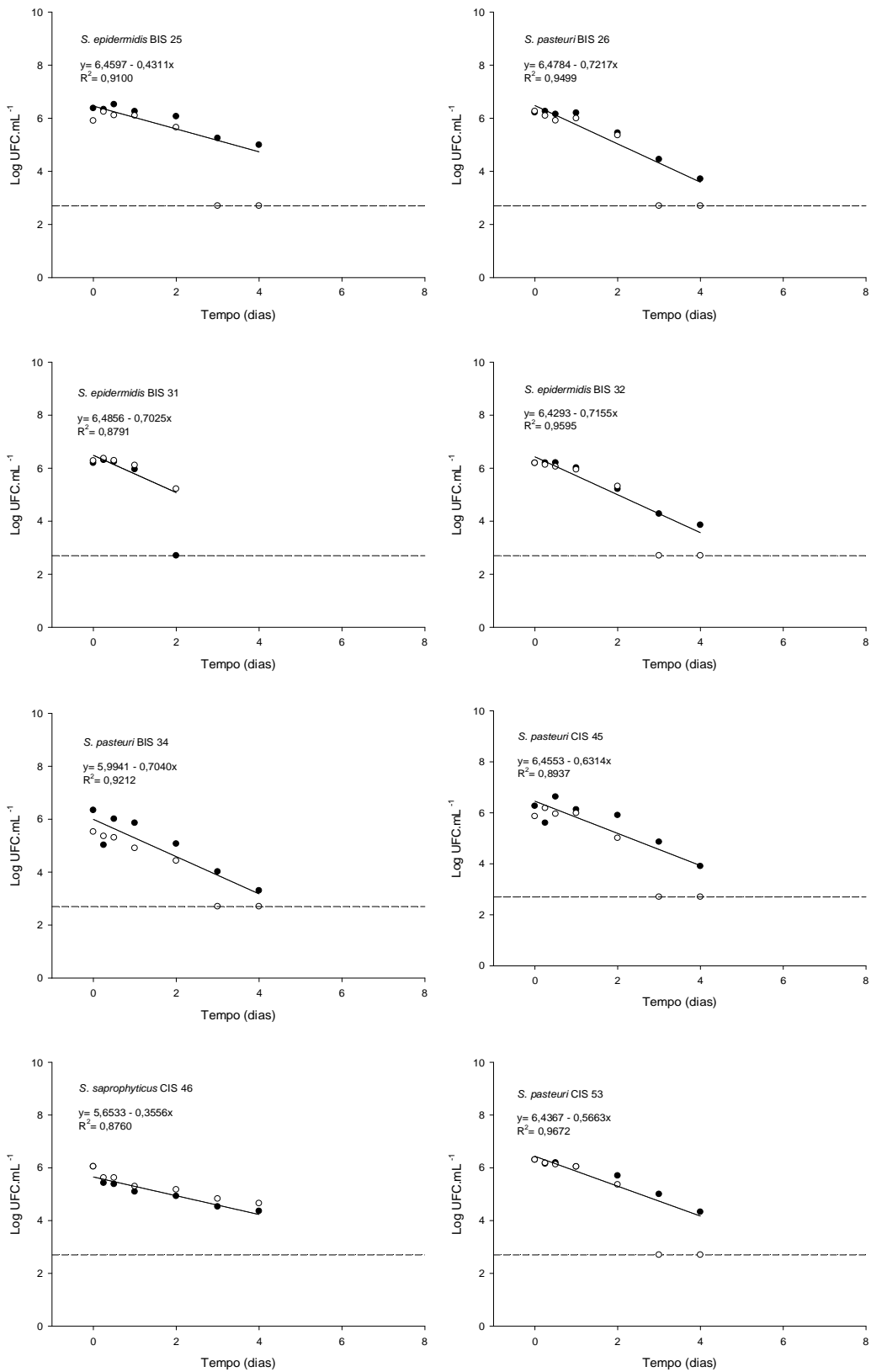
Os isolados de *L. monocytogenes* estudados não se desenvolveram e apresentaram cinética de inativação distinta no CS (Figura 7). As linhagens de

referência, ATCC 7644 e Scott A também apresentaram cinética de inativação distinta entre si. Isto pode indicar que linhagens de referências em estudos de sobrevivência e inativação devem ser múltiplas ou investigadas cuidadosamente. Os isolados de *L. monocytogenes* IP1-23 e IP1-26 originados de salame apresentaram cinética de inativação similar, entretanto o isolado IP1-23 resistiu por um tempo mais prolongado nas condições estudadas. Os isolados de *L. innocua* LMA 80, LMA 95 e LMA 98 originados de indústria de laticínios e o isolado *L. innocua* CERELA apresentaram cinética de inativação similar.

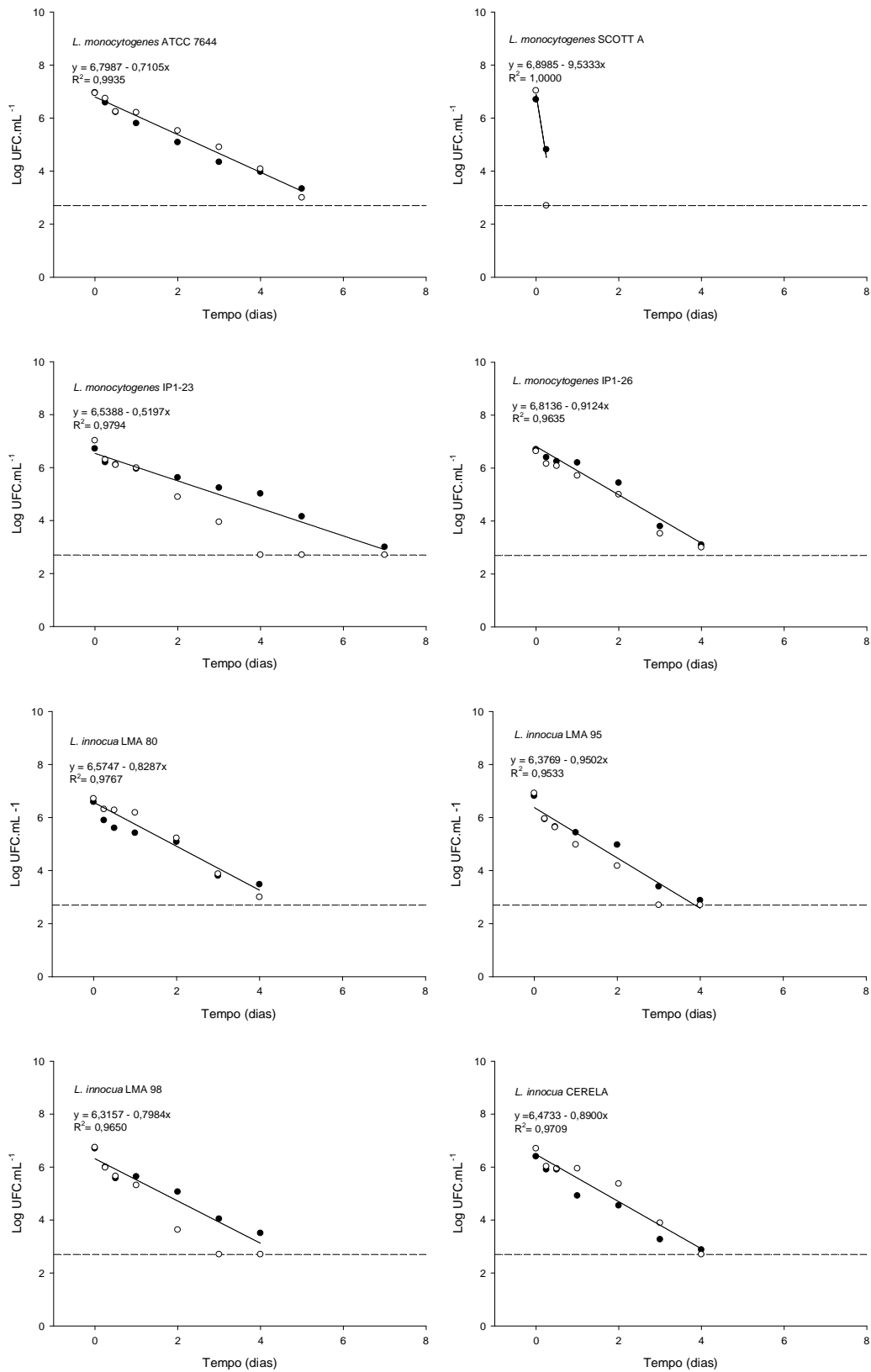
Embora *L. innocua* seja utilizada como modelo em estudos devido a sua semelhança à espécie patogênica *L. monocytogenes* (BUCHRIESER et al., 2003), os resultados mostraram que *L. monocytogenes* IP1-23 apresentou um comportamento diferente, sendo mais resistente nas condições estudadas do que os isolados de *L. innocua*. Este resultado demonstra que a extrapolação de resultados de *L. innocua* nem sempre deve ser tomado como o resultado final em estudos para segurança alimentar.

Os micro-organismos podem crescer melhor em carnes trituradas do que em carnes sem cortes. Na carne triturada a área de superfície para o crescimento de micro-organismos e a liberação de líquidos que contém os constituintes nutritivos protoplasmáticos das células é maior. O líquido da carne é um meio de crescimento ideal para diferentes micro-organismos por possuir umidade, conter os líquidos nutritivos celulares e também proteínas, lipídeos, vitaminas e açúcares (PEDERSON, 1979). Em CS os ingredientes adicionados estão distribuídos uniformemente, portanto as condições são mais homogêneas do que no salame *in situ*, que pode apresentar ambientes mais ou menos propícios para o crescimento microbiano, uma vez que os ingredientes podem estar distribuídos menos uniformemente. Sendo assim, as condições no caldo salame podem ser mais restritivas para os micro-organismos do que no salame *in situ*.

A partir desses resultados, o isolado de *L. monocytogenes* IP1-23, que resistiu por mais tempo nas condições estudadas, e o isolado de *L. innocua* LMA 80 foram selecionadas para a continuação dos estudos *in situ*.



**Figura 6.** Sobrevivência de *Staphylococcus* spp. em CS a 25 °C em aerobiose. (o) Repetição 1, (●) Repetição 2. A linha tracejada indica o limite de detecção do método utilizado.



**Figura 7.** Sobrevivência de *Listeria* spp. em CS a 25 °C em aerobiose. (o) Repetição 1, (●) Repetição 2. A linha tracejada indica o limite de detecção do método utilizado.

#### **4.4 Atividade de inibição do sobrenadante das culturas de *Staphylococcus* spp. sobre *Listeria* spp**

A atividade de inibição do sobrenadante das culturas de *Staphylococcus* spp. sobre as espécies de *Listeria* spp. foi avaliada pelo método de difusão em ágar. Não foi observada a atividade de inibição do sobrenadante das culturas de *Staphylococcus* spp. sobre as linhagens indicadoras de *Listeria* spp. em nenhum dos tratamentos.

A ausência de inibição no sobrenadante livre de células pode ser consequência de diversos fatores. De acordo com Ammor e colaboradores (2007), a substância inibitória produzida pode ficar aderida na parede da célula produtora e só terá efeito inibitório quando houver um contato entre a célula produtora e o micro-organismo indicador. Fatores adicionais podem estar envolvidos na indução da atividade da substância inibidora em meio líquido. Outro fator seria a incapacidade de produção ou produção em menor quantidade da substância inibitória em meio líquido, pois na natureza os micro-organismos se encontram em contato com superfícies sólidas. Ou ainda, por estar em baixas concentrações em meio líquido, a substância não apresenta o seu efeito inibitório.

Resultados semelhantes aos aqui reportados foram relatados no estudo de Teixeira de Carvalho e colaboradores (2006) quando testaram o sobrenadante não neutralizado e neutralizado de bactérias do ácido láctico isoladas de salame italiano contra *L. monocytogenes*, os halos foram sempre  $\leq 8$  mm. Entretanto, naquele estudo quando a atividade antagonista foi testada em meio sólido, pelo método ágar “spot”, halos maiores foram observados em todos os isolados depois de 24 horas.

#### **4.5 Atividade antagonista em meio sólido**

A atividade antagonista, imperceptível nos sobrenadantes da cultura em meio líquido, foi determinada pelo método de ágar “spot” quando as células foram cultivadas em superfície (Tabela 3).

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. contra *Listeria* spp. determinada pelo método ágar “spot”.

| Micro-organismo<br>indicador   | Micro-organismo produtor * |           |           |           |           |           |           |           |
|--------------------------------|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                | BIS<br>25                  | BIS<br>26 | BIS<br>31 | BIS<br>32 | BIS<br>34 | CIS<br>45 | CIS<br>46 | CIS<br>53 |
| <i>L. monocytogenes</i> IP1-23 | 4                          | 8         | 4         | 3         | 3         | 3         | -         | 5         |
| <i>L. innocua</i> LMA 80       | 6                          | 8         | -         | -         | 5         | 3         | -         | -         |

\* Valor do diâmetro em mm (sem o diâmetro do spot) da zona de inibição. Médias dos experimentos feitos em duplicata.

As médias dos diâmetros dos halos de inibição variaram de 3 mm a 8 mm, entretanto as zonas de inibição não foram nítidas. Medidas inferiores a 1,5 mm foram consideradas como ausência de inibição. Os isolados de *S. pasteurii*, BIS 26 e CIS 53 apresentaram os maiores halos de inibição contra *L. monocytogenes* IP1-23 e os isolados de *S. epidermidis* BIS 25 e de *S. pasteurii* BIS 26 apresentaram os maiores halos de inibição contra *L. innocua* LMA 80. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Villani e colaboradores (1994), quando a atividade antimicrobiana de *S. xylosus* isolados de salames tipo italiano foi testada contra *L. monocytogenes* os halos de inibição variaram de 3 mm a 12 mm, sendo que alguns halos não apresentaram nitidez. Teixeira De Carvalho e colaboradores (2006) testaram a atividade de inibição de bactérias do ácido láctico isoladas de salame tipo italiano pelo método ágar “spot” contra *L. monocytogenes* e após 24 horas todos os isolados apresentaram zonas de inibição de 20 mm ± 1,24.

Embora *L. innocua* seja aceita como modelo em estudos representando *L. monocytogenes*, no caso de inibidores específicos, nem sempre se pode aceitar esse paradigma. Fica evidente que, nesses casos, há necessidade de se desenvolverem métodos que usem linhagens diferentes de *L. innocua* ou mesmo que incluam linhagens diferentes de *L. monocytogenes*.

#### 4.6 Produção de ácidos orgânicos e etanol durante o crescimento de *Staphylococcus* spp. em caldo nutritivo

A Tabela 4 apresenta os resultados dos produtos detectados por HPLC em amostras de sobrenadantes de *Staphylococcus* spp. cultivados em CN.

Dentre os ácidos analisados, o ácido detectado em maior concentração foi o láctico e os isolados de *S. pasteurii* BIS 26, BIS 34, CIS 45 e CIS 53 e de *S. epidermidis* BIS 31 e BIS 32 apresentaram maiores porcentagens do mesmo, com valores entre 0,2 e 0,4 %.

Durante a fermentação do salame ocorre a produção de ácido láctico e consequente redução do pH do produto. Essa queda de pH influencia no sabor do produto final (ligeiramente picante), contribui para o desenvolvimento da textura e cor típica do salame e também, para a conservação e segurança do produto (LUCKE, 2000).

Em todas as amostras foram detectados outros ácidos como ácido acético, ácido fórmico e ácido succínico, porém não houve diferença significativa entre as médias dos isolados analisados.

O ácido acético é um ácido fraco e possui uma atividade antimicrobiana mais eficiente que o ácido láctico, isto ocorre devido à maior concentração de sua forma não dissociada, em relação à do ácido láctico. A concentração de ácido na forma dissociada ou não depende do pKa do ácido e do pH do alimento. Em alimentos que possuem pH maior do que o pKa do ácido, maior será a concentração da forma dissociada enquanto que, valores de pH menores do que o pKa do ácido, maior a concentração do ácido não dissociado. O ácido láctico possui um pKa de 3,86 e o ácido acético de 4,75 (JAY, 2005). O pH em produtos cárneos fermentados varia de 4,8 a 6,0 e nestas condições, o ácido acético é inibidor mais efetivo pois se encontra na forma não dissociada em maiores proporções que o ácido láctico (MARCHESINI et al., 1992).

O ácido acético contribui para o aroma em salames secos e pode ser produzido por bactérias do ácido láctico heterofermentativas, por *Staphylococcus* e também, pela oxidação de ácidos graxos e catabolismo da alanina. Em carnes, o principal ácido orgânico formado é o ácido láctico e, somente baixa concentração de ácido acético é aceitável sensorialmente. Entretanto, o efeito antimicrobiano do ácido acético em carnes não deve ser negligenciado porque nas condições de pH da carne, o ácido acético é um inibidor mais efetivo que o ácido láctico (LUCKE, 2000).

**Tabela 4.** Percentagens (g.L<sup>-1</sup>) dos tipos de ácidos e de etanol detectados nas amostras de sobrenadantes de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos analisados por HPLC referentes aos isolados provenientes de salame tipo italiano de fermentação natural.

| Isolados                       | Ác. láctico | Ác. acético | Ác. fórmico | Ác. succínico | 2,3-butanodiol | Etanol   |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------|----------------|----------|
| <b><i>S. epidermidis</i></b>   |             |             |             |               |                |          |
| BIS 25                         | 0,3667 b    | 0,0764 a    | 0,0330 a    | 0,0361 a      | 0,0312 a       | 0,0053 b |
| BIS 31                         | 0,4285 a    | 0,1047 a    | 0,0526 a    | 0,0523 a      | 0,0380 a       | 0 b      |
| BIS 32                         | 0,4434 a    | 0,1068 a    | 0,0614 a    | 0,0576 a      | 0,0501 a       | 0,0223 a |
| <b><i>S. pasteurii</i></b>     |             |             |             |               |                |          |
| BIS 26                         | 0,4310 a    | 0,0807 a    | 0,0322 a    | 0,0399 a      | 0 a            | 0 b      |
| BIS 34                         | 0,4465 a    | 0,0879 a    | 0,0382 a    | 0,0479 a      | 0,0007 a       | 0 b      |
| CIS 45                         | 0,4074 a    | 0,0873 a    | 0,0570 a    | 0,0660 a      | 0,0207 a       | 0,0099 b |
| CIS 53                         | 0,4369 a    | 0,1119 a    | 0,0623 a    | 0,0579 a      | 0,0578 a       | 0 b      |
| <b><i>S. saprophyticus</i></b> |             |             |             |               |                |          |
| CIS 46                         | 0,2266 c    | 0,0859 a    | 0,0286 a    | 0,0758 a      | 0 a            | 0 b      |

As médias seguidas de uma mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de agrupamento de Scott – Knott.

A sensibilidade a estes ácidos varia entre as bactérias e também depende da ação simultânea de outros fatores como atividade de água e nitrito (LUCKE, 2000).

Não houve diferença significativa na detecção de 2,3 butanodiol. O etanol foi detectado em maior concentração na amostra do isolado de *S. epidermidis*.BIS 32.

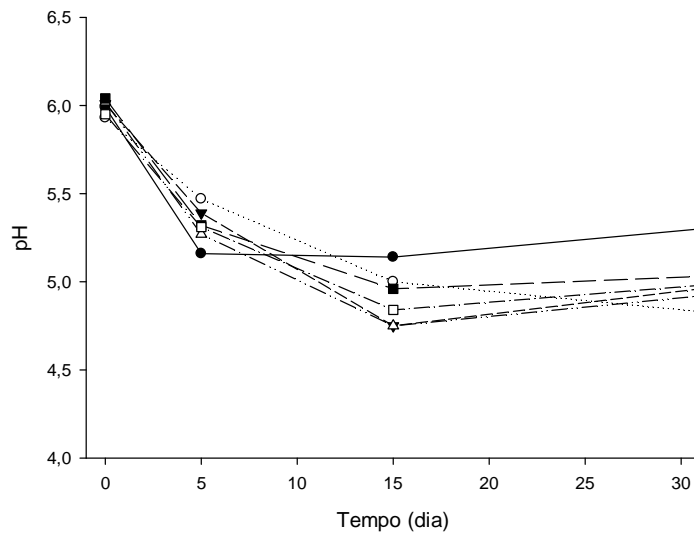
#### **4.7 Crescimento e sobrevivência de *Staphylococcus* e de *Listeria* em salame tipo italiano**

O comportamento de *Staphylococcus* e *Listeria* em salame tipo italiano fermentado por cinco dias e maturado até 31 dias foram estudados.

Redução mais acentuada do pH foi observada no período de fermentação correspondente aos primeiros cinco dias após o processamento (Figura 8). A queda rápida do pH durante a fermentação é assegurada pela adição da cultura *starter* que produz ácido láctico pela metabolização do açúcar presente na massa do salame (LUCKE, 2000). A redução do pH de 6,2 - 6,6 para 4,2 - 5,0 (PEDERSON, 1979) é fundamental para a inibição de microorganismos indesejáveis.

A menor redução do pH observada entre os dias cinco e 15 de maturação (Figura 8) pode ser atribuída a fatores como inibição da microbiota fermentadora pelo próprio ácido produzido, exaustão de carboidratos, abaixamento da temperatura de 25 °C para 15 °C, redução da  $a_w$  entre outros fatores.

O pH final dos salames tipo italiano variou entre 4,8 e 5,3 e naqueles salames em que foi adicionado somente a cultura *starter* Bactoferm SM-199, o pH final foi mais alto (Figura 8). O pH final do salames produzidos comercialmente varia entre 4,5 e 5,2 (JAY, 2005). Um pequeno aumento no pH foi observado ao longo do final do período de maturação nos tratamentos A, C, D, E e F. Variações no pH podem ocorrer ao longo da maturação e os aumentos observados podem ser atribuídos a formação de amins e amônia (LUCKE, 1986).



**Figura 8.** Variação do pH durante a fermentação e maturação do salame tipo italiano nos diferentes tratamentos. A: Bactoferm SM-199 (●); B: Bactoferm SM-199, *S. pasteurii* BIS 26 (○); C: Bactoferm SM-199, *S. pasteurii* BIS 26, *L. monocytogenes* IP1-23 (▼); D: Bactoferm SM-199, *S. pasteurii* BIS 26, *L. innocua* LMA 80 (△); E: Bactoferm SM-199, *L. monocytogenes* IP1-23 (■); F: Bactoferm SM-199, *L. innocua* LMA 80 (□).

Os resultados das contagens de bactérias lácticas, *Staphylococcus* sp. e *Listeria* sp. estão apresentados na Tabela 5. As contagens representam as bactérias que foram adicionadas ao salame durante o processamento e as que fazem parte da microbiota contaminante da carne e dos condimentos.

O número de células viáveis das bactérias do ácido láctico aumentou em no máximo, 1,5 ciclos log nos primeiros cinco dias de fermentação do salame tipo italiano (Tabela 5). A adição de *S. pasteurii* BIS 26 feitas nos salames dos tratamentos B, C e D não inibiu a cultura *starter* Bactoferm SM-199, que se manteve em população máxima da ordem de  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>. As condições estabelecidas durante o processo de fermentação do salame selecionam bactérias lácticas que chegam a contagens de  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> e provocam a acidificação do produto (BACUS, 1984). Espécies de *Micrococcaceae* não devem exibir atividade antagonista contra bactérias lácticas para serem selecionadas como culturas *starter* e um sinergismo entre esses dois grupos de micro-organismos é essencial (FIORENTINI et al., 2009).

**Tabela 5.** Contagens microbianas durante a fermentação e maturação do salame tipo italiano.

| Tempo (dia) | Tratamento*                                      |                      |                      |                      |                      |                      |
|-------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|             | A  | B                    | C                    | D                    | E                    | F                    |
|             | Bactérias Lácticas (UFC.g <sup>-1</sup> )        |                      |                      |                      |                      |                      |
| 0           | 1,1x10 <sup>6</sup>                              | 1,5 x10 <sup>6</sup> | 1,7 x10 <sup>7</sup> | 1,2 x10 <sup>7</sup> | 4,6 x10 <sup>7</sup> | 8,1 x10 <sup>6</sup> |
| 5           | 2,6 x10 <sup>7</sup>                             | 5,8 x10 <sup>7</sup> | 6,7 x10 <sup>7</sup> | 7,0 x10 <sup>7</sup> | 1,8 x10 <sup>7</sup> | 6,0 x10 <sup>7</sup> |
| 15          | 2,4 x10 <sup>7</sup>                             | 4,3 x10 <sup>7</sup> | 7,2 x10 <sup>7</sup> | 2,6 x10 <sup>7</sup> | 1,0 x10 <sup>7</sup> | 2,7 x10 <sup>7</sup> |
| 31          | 7,9 x10 <sup>6</sup>                             | 1,6 x10 <sup>7</sup> | 2,3 x10 <sup>7</sup> | 1,5 x10 <sup>7</sup> | 7,1 x10 <sup>6</sup> | 1,7 x10 <sup>7</sup> |
|             | <i>Staphylococcus</i> sp. (UFC.g <sup>-1</sup> ) |                      |                      |                      |                      |                      |
| 0           | <10 x10 <sup>4</sup>                             | 2,9 x10 <sup>6</sup> | 1,4 x10 <sup>7</sup> | 1,0 x10 <sup>7</sup> | 2,3 x10 <sup>7</sup> | 1,2 x10 <sup>7</sup> |
| 5           | 1,2 x10 <sup>5</sup>                             | 6,1 x10 <sup>5</sup> | 2,4 x10 <sup>6</sup> | 3,3 x10 <sup>6</sup> | 1,3 x10 <sup>6</sup> | 3,1 x10 <sup>6</sup> |
| 15          | <10 x10 <sup>4</sup>                             | 4,0 x10 <sup>5</sup> | 1,9 x10 <sup>6</sup> | 1,7 x10 <sup>6</sup> | 1,4 x10 <sup>6</sup> | 3,1 x10 <sup>6</sup> |
| 31          | <10 x10 <sup>3</sup>                             | <10 x10 <sup>3</sup> | 6,9 x10 <sup>5</sup> | 5,4 x10 <sup>5</sup> | 1,5 x10 <sup>5</sup> | 1,4 x10 <sup>6</sup> |
|             | <i>Listeria</i> sp. (UFC.g <sup>-1</sup> )       |                      |                      |                      |                      |                      |
| 0           | <10 x10 <sup>3</sup>                             | <10 x10 <sup>3</sup> | 1,7 x10 <sup>7</sup> | 7,9 x10 <sup>6</sup> | 1,8 x10 <sup>7</sup> | 1,1 x10 <sup>7</sup> |
| 5           | <10 x10 <sup>2</sup>                             | <10 x10 <sup>2</sup> | 3,8 x10 <sup>6</sup> | 3,1 x10 <sup>6</sup> | 6,5 x10 <sup>5</sup> | 3,1 x10 <sup>6</sup> |
| 15          | <10 x10 <sup>2</sup>                             | <10 x10 <sup>2</sup> | 1,3 x10 <sup>6</sup> | 1,8 x10 <sup>6</sup> | 1,9 x10 <sup>6</sup> | 2,2 x10 <sup>6</sup> |
| 31          | <10 x10 <sup>2</sup>                             | <10 x10 <sup>2</sup> | 6,1 x10 <sup>5</sup> | 4,2 x10 <sup>5</sup> | <10 x10 <sup>2</sup> | 1,3 x10 <sup>6</sup> |

\* **A:** Bactoferm SM-199; **B:** Bactoferm SM-199, *S. pasteurii* BIS 26; **C:** Bactoferm SM-199, *S. pasteurii* BIS 26, *L. monocytogenes* IP1-23; **D:** Bactoferm SM-199, *S. pasteurii* BIS 26, *L. innocua* LMA 80; **E:** Bactoferm SM-199, *L. monocytogenes* IP1-23; **F:** Bactoferm SM-199, *L. innocua* LMA 80

Contagens de *Staphylococcus* sp. foram encontradas em números elevados, 10<sup>5</sup> a 10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, em salames que não foram inoculados com a cultura de *S. pasteurii* BIS 26, como os dos tratamentos E e F (Tabela 5). A redução de até 3 ciclos log na população de *Staphylococcus* durante o processo de fermentação e maturação do salame pode ter ocorrido em razão das mudanças das condições de pH, da microbiota e da presença de ácidos. Contagens de *Staphylococcus* não foram feitas entre 0 e 5 dias, quando pode ter havido condições para o crescimento dessas bactérias, antes da acidificação importante do meio. Alguns estudos também observaram a redução do número de células viáveis de *Staphylococcus* durante a fermentação dos salames (SORENSEN e JAKOBSEN, 1996; GARDINI et al., 2002; TJERNER et al., 2003) e essa redução é frequentemente atribuída a diminuição do pH e a restrição de oxigênio (TJERNER et al., 2003). Sorensen e

Jakobsen (1996) concluíram que as condições de fermentação do salame, em geral, não são favoráveis para o crescimento de *S. xylosum*.

Não foi detectada a presença de *Listeria* sp. em 25 g da matéria-prima e no produto final dos tratamentos A e B, não inoculados com esta bactéria, nas diluições testadas (Tabela 5).

Nos tratamentos que houve a adição de *L. monocytogenes* IP1-23 ou *L. innocua* LMA 80, foi observado um decréscimo de cerca de 1 a 5 ciclos log no número de células viáveis de *Listeria* sp. durante o período de fermentação e maturação do salame (Tabela 5). Esta redução pode ter ocorrido provavelmente por causa da diminuição do pH (Figura 8) e da associação de outros fatores presentes no embutido como a adaptação da espécie na matriz da carne, o processo fermentativo, as condições microclimáticas, dentre outros (ZDOLEC et al., 2007).

Estudos mostram que as próprias condições durante o processamento e a maturação dos salames feitos sem a adição de cultura *starter* podem inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos. Zdolec e colaboradores (2007) monitoraram o crescimento de *L. monocytogenes* durante o período de maturação de salames secos fermentados naturalmente. A contagem inicial de *Listeria* inoculada nos salames foi de  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> e reduziu para  $< 10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> no final da maturação. O crescimento de *Listeria* foi inibido provavelmente pela diminuição do pH e por mecanismos antimicrobianos da microbiota competitiva.

A diferença observada entre os tratamentos C e D e entre os tratamentos E e F indica que *L. monocytogenes* foi mais sensível que *L. innocua*. A espécie não patogênica *L. innocua* é utilizada em pesquisas na microbiologia de alimentos devido à sua semelhança a espécie patogênica *L. monocytogenes* (BUCHRIESER et al., 2003). A presença de *L. innocua* indica a potencial presença de *L. monocytogenes* (ENCINAS et al., 1999). Portanto, os resultados deste trabalho reforçam que a utilização de *L. innocua* em pesquisas para avaliar o comportamento de *L. monocytogenes* em salames é viável, pois a ausência desta no alimento é indicativa da ausência da espécie patogênica. Porém, conforme observado nos resultados *in vitro* mais de uma espécie deve ser utilizada para confirmar este fato. O número de *L. monocytogenes* reduz substancialmente durante a fermentação e a maturação dos salames, entretanto esse micro-organismo, que é ubiqüitário,

psicrotrófico e relativamente resistente aos ingredientes de cura, pode sobreviver (ENCINAS et al., 1999).

O número de ciclos logarítmicos reduzidos na população de *Listeria* no tratamento C foi de aproximadamente 2 ciclos log, onde foi também adicionada a cultura de *S. pasteurii* BIS 26, e no tratamento E, foi de 5 ciclos log. Possivelmente, a adição de *S. pasteurii* BIS 26 pode ter interferido no efeito de fatores inibitórios como, antagonismo láctico, diminuição do pH, ácidos orgânicos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diacetil e de outros produtos responsáveis pelo efeito inibitório (JAY, 2005).

## 5 CONCLUSÕES

Condições de temperatura e tensão de oxigênio que propiciaram as maiores velocidades específicas de crescimento de *Staphylococcus* spp. coincidem com as que resultam em maiores velocidades específicas para *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* em meios laboratoriais complexos.

O modelo caldo salame, proposto para simular o salame, não refletiu as condições reais desse produto.

Não foi observada atividade de inibição no sobrenadante das culturas de *Staphylococcus* spp. sobre as linhagens indicadoras de *Listeria* spp. porém, a inibição foi detectada no cultivo em superfície, pelo método Agar “spot”.

O ácido láctico foi o detectado em maior concentração na análise de amostras de sobrenadantes de *Staphylococcus* spp por HPLC.

A adição de *S. pasteurii* BIS 26 no salame não causou inibição no crescimento da cultura *starter*, porém pode ter interferido no efeito de fatores inibitórios contra *Listeria*.

*L. monocytogenes* foi mais sensível que *L. innocua* no salame, porém nos estudos *in vitro* foi mais resistente. Isso pode significar que nem sempre

*L. monocytogenes* pode ser substituída por *L. innocua* em estudos de segurança alimentar.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASEN I. M., MARKUSSEN S., MORETRO T., KATLA T., AXELSSON L., NATERSTAD K. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. **International Journal of Food Microbiology**, v.87, 35-43, 2003.
- AFSSA. Avis de l' Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la classification des aliments selon de danger représenté par *Listeria monocytogenes*. 29/10/01, 2001.
- AFSSA. Rapport de la Commission D'étude des Risques liés à *Listeria monocytogenes*, 2000. Disponível em: < <http://www.afssa.fr> >. Acesso em: 9 de maio de 2006.
- ALBANO H., OLIVEIRA M., AROSO R., CUBERO N., HOGG T., TEIXEIRA P. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from "Alheiras" (traditional Portuguese fermented sausages): *In situ* assays. **Meat Science**, v.76, 796-800, 2007.

- AMMOR M. S., MAYO B. Selection criteria for acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. **Meat Science**, v.76, 138- 146, 2007.
- ANONYMOUS. Microbiological Risk Assessment Series, n°5, **Technical Report**, WHO, Rome, 2004.
- ARTOLA B. S., HERREJÓN E. P. Infecciones por *Listeria*. **Medicine**, v.10, 3368-3372, 2010.
- ASADUZZAMAN S. M., SONOMOTO K. Lantibiotics: Diverse activities and unique modes action. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.107, 475-487, 2009.
- BACUS J. **Utilization of microorganisms in meat processing: a handbook for meat plant operators**. Letchworth: Research Studies Press, 1984. 169 p.
- BALDINI P., CANTONI E., COLLA F., DIAFERIA C., GABBA L., SPOTTI E., MARCHELLI R., DOSSENA A., VIRGILI E., SFORZA S., TENCA P., MANGIA A., JORDANO R., LOPEZ M. C., MEDINA L., COUDURIER S., ODDOU S., SOLIGNAT G. Dry sausages ripening: influence of thermohygrometric conditions on microbiological, chemical and physico-chemical characteristics. **Food Research International**, v. 33, 161-170, 2000.
- BARRIÈRE C., CENTENO D., LEBERT A., LEROY-SËTRIN S., BERDAGUË J. L., TALON R. Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. **FEMS Microbiology Letters**, v.201, 181-185, 2001.
- BARROS M. A. F., NERO L. A., SILVA L. C., D'OVIDIO L., MONTEIRO F. A., TAMANINI R., FAGNANI R., HOFER E., BELOTI V. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science**, v.76, 591-596, 2007.

- BECK H. C., HANSEN A. M., LAURITSEN F. R. Catabolism of leucine to branched-chain fatty acids in *Staphylococcus xylosus*. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 96, 1185-1193, 2004.
- BERGEY, D. H.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Lippincott Williams e Wilkins, 9 ed., 1994. 787 p.
- BRASIL, 1996. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n. 146 de 07 de março de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos**. DOU 11 de março de 1996.
- BRASIL, 1998. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Ofício: AUO/DOI/DIPOA n.563. **Autorização de uso de produto**.
- BRASIL, 2000. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa n. 22 de 31 de setembro de 2000. **Regulamento técnico de Identidade e Qualidade do Salame tipo italiano**.
- BRASIL, 2001. Resolução RDC n.o 12 de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>
- BUCHRIESER C., RUSNIOK C., KUNST F., COSSART P., GLASER P. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.35, 207-213, 2003.
- CAPLICE E., FITZGERALD G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, 131-149, 1999.
- CASABURI A., ARISTOY M-C, CAVELLA S., DI MONACO R., ERCOLINI D., TOLDRÁ F., VILLANI F. Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of *starter* cultures. **Meat Science**, v.76, 295-307, 2007.

- CENCI-GOGA B. T., RANUCCI D., MIRAGLIA D., CIOFFI A. Use of *starter* cultures of dairy origin in the production of Salame nostrano, an Italian dry-cured sausage. **Meat Science**, v.78, 381-390, 2008.
- CHASCO J., LIZASO G., BERIAIN M. J. Cured colour development during sausage processing. **Meat Science**, v.44, 203-211, 1996.
- CHOWDHURY R., SAHU G. K., DAS J. Stress response in pathogenic bacteria. **Journal of Biosciences**, v.21, 149-160, 1996.
- COLAK H., HAMPIKYAN H., ULUSOY B., BINGOL E. B. Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermented sausage (sucuk). **Food Control**, v.18, 30-32, 2007.
- COPPOLA R., IORIZZO M., SAOTTA R., SORRENTINO E., GRAZIA L. Characterization of micrococci and staphylococci isolated from soppressata molisana, a Southern Italy fermented sausage. **Food Microbiology**, v.14, 47-53, 1997.
- CORBIERE MOROT-BIZOT S., LEROY S., TALON R. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, 210-217, 2006.
- COTTER P. D., HILL C., ROSS P. R. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, 777-788, 2005.
- CRUZ C. D., MARTINEZ M. B., DESTRO M. T. *Listeria monocytogenes*: Um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v.19, 195-206, 2008.
- DEIWICK J., NIKOLAUS T., ERDOGAN S., HENSEL M. Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. **Molecular Microbiology**, v.31, 1759-1773, 1999.
- DE PAULA R. A. Bacteriocinas de bactérias do ácido láctico isoladas de salame tipo italiano. Viçosa: UFV. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

- DICKS L. M. T., MELLET F. D., HOFFMAN L. C. Use of bacteriocin producing *starter* cultures of *Lactobacillus plantarum* and *curvatus* in production of ostrich meat salami. **Meat Science**, v.66, 703-708, 2004.
- DIEP D. B., SKAUGEN M., SALEHIAN Z., HOLO H., NES I. F. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. **PNAS**, v.104, 2384-2389, 2007.
- DROSINOS E. H., MATARAGAS M., XIRAPHI N., MOSCHONAS G., GAITIS F., METAXOPOULOS J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v.69, 307-317, 2005.
- ENCINAS J-P, SANZ J-J. GARCÍA-LÓPEZ M-L, OTERO A. Behaviour of *Listeria* spp. in naturally contaminated chorizo (Spanish fermented sausage). **International Journal of Food Microbiology**, v.46, 167-171, 1999.
- ESSID I., ISMAIL H. B., AHMED S. B. H., GHEDAMSI R., HASSOUNA M. Characterization and technological properties of *Staphylococcus xylosus* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. **Meat Science**, v.77, 204-212, 2007.
- FARBER J. M., PETERKIN P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v.55, 476-511, 1991.
- FIORENTINI A. M., SAWITZKI M. C., BERTOL T. M., SANT' ANNA E. Viability of *Staphylococcus xylosus* isolated from artisanal sausages for application as *starter* cultures in meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, 129-133, 2009.
- GAHAN C. G. M., COLLINS J. K. Listeriosis: biology and implications for the food industry. **Trends Food Science Technology**, v.2, 89-93, 1991.
- GARDINI F., MARTUSCELLI M., CRUDELE M. A., PAPARELLA A., SUZZI G. Use of *Staphylococcus xylosus* as a *starter* culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. **Meat Sciencen**, v.61, 275-283, 2002.

- GEISEN R., LÜCKE F. K., KRÖCKEL L. *Starter* and protective cultures for meat and meat products. **Fleischwirtschaft**, v.72, 894-898, 1992.
- GILLOR O., ETZION A., RILEY M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.81, 591-606, 2008.
- GOULET V., DE VALK H., PIERRE O., STAINER F., ROCOURT J., VAILLANT V., JACQUET C., DESENCLOS J-C. Effect of prevention measures on incidence of human Listeriosis, France, 1987-1997. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, 983-989, 2001.
- GUDBJÖRNSDÓTTIR B., SUIHKO M-L., GUSTAVSSON P., THORKELSSON G., SALO S., SJÖBERG A-M., NICLASSEN O., BREDHOLT S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**, v.21, 217-225, 2004.
- HAMON M., BIERNE H., COSSART P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. **Nature Reviews Microbiology**, v.4, 423-434, 2006.
- HÉCHARD Y., SAHL H. G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. **Biochimie**, v.84, 545-557, 2002.
- HEITHOFF D. M., CONNER C. P., HENTSCHEL U., GOVANTES F., HANNA P. C, MAHAN M. J. Coordinate intracellular expression of *Salmonella* genes induced during infection. **Journal. Bacteriology**, v.181, 799-807, 1999.
- HUGAS M., GARRIGA M., AYMERICH M. T., MONFORT J. M. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. **Journal of Applied Bacteriology**, v.79, 322-330, 1995.
- HUGAS M., MONFORT J. MA. Bacterial *starter* cultures for meat fermentation. **Food Chemistry**, v.56, 547-554, 1997.
- IRLINGER F. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, 302-310, 2008.

- ISO 11290 – 1: Microbiology of food and animal feeding stuffs horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*, 1996.
- JACK R. W., TAGG J. R., RAY B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, v.59, 171-200, 1995.
- JAY J. M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 69, 76, 112 p
- LAUKOVÁ A., SIMONOVÁ M., STROMPFOVÁ V. *Staphylococcus xylosum* S03/1M/1/2, bacteriocin-producing meat *starter* culture or additive. **Food Control**, 2010. Accepted Manuscript
- LEROY, F. VERLUYTEN, J. DE VUYST, L. Functional meat *starter* cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, 270- 285, 2006.
- LÜCKE, F-K. Microbiological processes in the manufacture of dry sausage and raw ham. **Fleischwirtsch**, v. 66, 1505-1509, 1986.
- LÜCKE F-K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v.56, 105-115, 2000.
- MACIEL, J. F. **Atividade antibacteriana de culturas lácticas isoladas de salame tipo italiano processado por fermentação natural**. Viçosa: UFV. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1998.
- MARCHESINI, B., BRUTTIN, A., ROMAILLER, N., MORETON, R.S., STUCCHI, C., SOZZI, T. Microbiological events during commercial meat fermentations. **Journal Applied Bacteriology**, v.73, p.203-209, 1992.
- MARTIN A., COLIN B., ARANDA E., BENITO M. J., CORDOBA M. G. Characterization of *Micrococcaceae* isolated from Iberian dry-cured sausages. **Meat Science**, v.75, 696-708, 2007.

- MAURIELLO G., CASABURI A., BLAIOTTA G., VILLANI F. Isolation and technological properties of coagulase negative *Staphylococci* from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**, v.67, 149-158, 2004.
- MOLLER J. K. S., SKIBSTED L. H. Nitric oxide and myoglobins. **Chemical Reviews**, v.102, 1167-1178, 2002.
- MONTEL M-C., TALON R., CANTONNET M., FOURNAUD J. Identification of *Staphylococcus* from French dry sausage. **Letters in Applied Microbiology**, v.15, 73-77,1992.
- OLESEN P. T., MEYER A. S., LOUISE H. S. Generation of flavour compounds in fermented sausages—the influence of curing ingredients, *Staphylococcus starter* culture and ripening time. **Meat Science**, v.66, 675-687, 2004.
- OLIVEIRA I. H. T. **Caracterização bioquímica de cocos Gram-positivos isolados de salame tipo italiano para uso como cultura starter: atividade antagonista, atividade de catalase e de nitrate redutase e produção e degradação de aminos biogênicas.** Viçosa: UFV. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.
- PEDERSON, C. S. Fermented sausage. In: PEDERSON, C.S. (Ed.) **Microbiology of Food Fermentations**, 2.ed., Westport: AVI Publishing, 1979. p.213, 218, 222, 227, 229.
- REBAGLIATI V., PHILIPPI R., ROSSI M., TRONCOSO A. Prevention of foodborne listeriosis. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v.52, 145-149, 2009.
- ROCOURT J., JACQUET CH., REILLY A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, 97-209, 2000.
- ROSS R. P., MORGAN S., HILL C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v.79, 3-16, 2002.

- SARANTINOPOULOS P., LEROY F., GEORGALAKI M. D., KALANTZOPOULOS G., TSAKALIDOU E., DE VUYST L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct *starter* in Greek Feta cheese making. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, 125-136, 2002.
- SHANK F. R., ELLIOT E. L., WACHSMUTH I. K. LOSIKOFF M. E. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Control**, v.7, 229-234, 1996.
- SIMONOVÁ M., STROMPFOVÁ V., MARCINÁKOVÁ M., LAUKOVÁ A., VESTERLUND S., MORATALLA M. L., BOVER-CID S., VIDAL-CAROU C. Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. **Meat Science**, v.73, 559-564, 2006.
- SIRIKEN B., PAMUK S., ÖZAKIN C., GEDIKOGLU S., EYIGÖR M. A note on the incidences of *Salmonella* spp., *Listeria* spp. And *Escherichia coli* O157:H7 serotypes in Turkish sausage (Soudjouck). **Meat Science**, v.72, 177-181, 2006.
- SORENSEN B. B., JAKOBSEN M. The combined effects of environmental conditions related to meat fermentation on growth and lipase production by the *starter* culture *Staphylococcus xylosus*. **Food Microbiology**, v.13, 265-274, 1996.
- SPELHAUG S. R., HARLANDER S. K. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. **Journal of Food Protection**, v.52, 856-862, 1989.
- SWAMINATHAN B., GERNER-SMIDT P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v.9, 1236-1243, 2007.
- TALON R., WALTER D., CHARTIER S., BARRIÈRE C., MONTEL M.C. Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v.52, 47-56, 1999.

- TEIXEIRA DE CARVALHO A. A., DE PAULA R. A. MANTOVANI H. C., DE MORAES C. A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. **Food Microbiology**, v.23, 213-219, 2006.
- THÉVENOT D., DELIGNETTE-MULLER M.L., CHRISTIEANS S., VERNZOY-ROZAND C. Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v.101, 189-200, 2005.
- TJENER K., STAHNKE L. H., ANDERSEN L., MARTINUSSEN J. A Fermented meat model system for studies of microbial aroma formation. **Meat Science**, v.66, 211-218, 2003.
- TRISTÃO I. H. **Bactérias isoladas de salame tipo italiano e sua resistência a antibióticos e as bactérias lácticas**. Viçosa: UFV. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1998.
- TYÖPPÖNEN (NÉE ERKKILÄ) S., MARKKULA A., PETÄJÄ E., SUIHKO M-L, MATTILA-SANDHOLM T. Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat *starter* cultures. **Food Control**, v.14, 181-185.
- VERLUYTEN J., MESSENS W., DE VUYST L. The curing agent sodium nitrite, used in the production of fermented sausages, is less inhibiting to the bacteriocin-producing meat *starter* culture *Lactobacillus curvatus* LHT 1174 under anaerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, 3833-3839, 2003.
- VIGNOLO G., FADDA S., KAIRUZ DE M. N., HOLGADO A. P. DE R., OLIVER G. Effects of curing additives on the control of *Listeria monocytogenes* by lactocin 705 in meat slurry. **Food Microbiology**, v.15, 259-264, 1998.
- VILLANI F., PEPE O., MAURIELLO G., SALZANO G., MOSCHETTI G., COPPOLA S. Antimicrobial activity of *Staphylococcus xylosus* from Italian

sausages against *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.18, 159-161, 1994.

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, 194-203, 2008.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: [http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2009/food\\_standards\\_20090706/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2009/food_standards_20090706/en/). Acessado em: 24/08/2010.

ZDOLEC N., KOZACONSKI L. HADZIOSMANOVIC M., CVRTILA Z., FILIPOVIC I. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in dry fermented sausages. **Veterinarski Arhiv**, v.77, 507-514, 2007.