

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRISTINA MARIA ZANETTE

**EFEITOS DA ADIÇÃO DE CULTURA *STARTER* BACTERIOCINOGÊNICA
PRODUZIDA POR *Lactobacillus plantarum* SOBRE *Listeria monocytogenes* EM
LINGUIÇA COLONIAL**

CURITIBA
2010

CRISTINA MARIA ZANETTE

**EFEITOS DA ADIÇÃO DE CULTURA *STARTER* BACTERIOCINOGÊNICA
PRODUZIDA POR *Lactobacillus plantarum* SOBRE *Listeria monocytogenes* EM
LINGUIÇA COLONIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Bersot

Co-orientador: Prof. Dr. Renato João Sossela de Freitas

**CURITIBA
2010**

Zanette, Cristina Maria

Efeitos da adição de cultura *starter* bacteriocinogênica produzida por *Lactobacillus plantarum* sobre *Listeria monocytogenes* em linguiça colonial / Cristina Maria Zanette. - Curitiba, 2010.

88 f.: il., tabs, grafs.

Orientador: Luciano Bersot

Co-orientador: Renato João Sossela de Freitas

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

1. Embutidos. 2. Microbiologia industrial. 3. Bacteriologia - Cultura e meios de cultura. 4. Lactobacilo. I. Bersot, Luciano. II. Freitas, Renato João Sossela de. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDD 664.024

CRISTINA MARIA ZANETTE

**EFEITOS DA ADIÇÃO DE CULTURA STARTER
BACTERIOCINOGÊNICA PRODUZIDA POR *Lactobacillus
plantarum* SOBRE *Listeria monocytogenes* EM LINGUIÇA
COLONIAL**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador:


Prof. Dr. LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
Campus Palotina, UFPR


Prof. Dr. OSMAR ROBERTO DALLA SANTA
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, UNICENTRO


Prof.^a Dr.^a MARCIA REGINA BEUX
Setor de Ciências Biológicas, UFPR

Curitiba, 22 de abril de 2010.

AGRADECIMENTOS

À Deus, aquele que nos concede o dom da vida, que ilumina nossos caminhos e nos dá força para superar os obstáculos encontrados.

Aos meus pais, Vitor e Maria Cristina, pelo exemplo de vida e pelo amor incondicional. À vocês que sempre se esforçaram para que eu tivesse a melhor educação e me incentivaram a lutar pelos meus sonhos.

Ao meu irmão João Vitor por todos os momentos alegres que me proporciona, pelo incentivo e pelo exemplo de determinação e dedicação.

Ao Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot, por me conceder a oportunidade de trabalho, pela confiança em mim depositada, pela amizade e pela dedicação em fazer com que este projeto se concretizasse.

Ao Prof. Dr. Osmar Roberto Dalla Santa, pela amizade, apoio, colaboração no desenvolvimento deste trabalho e pela orientação desde a graduação.

À Prof. Dra. Elaine C. Pereira de Martinis pela oportunidade de estágio no Laboratório de Microbiologia da FCFRP-USP e pelos ensinamentos das técnicas para o estudo de bacteriocinas de bactérias lácticas.

Aos queridos amigos do Laboratório de Controle Microbiológico de Água e Alimentos, Rosana, Rúbia, Cibeli, Raquel, Mariana, Jorge, Paulo, Valéria e Mallú, pela contribuição na execução dos experimentos, companheirismo e por todos os momentos de descontração.

Ao Felipe pelo amor, companheirismo e apoio.

A Prof. Dra. Érica Cristina B. Guirro pela colaboração com a análise estatística.

À Maryana, Ariana, Danielle, Diego, Maike e Roberto pela amizade, conselhos, e pelo incentivo na concretização deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da UFPR pela amizade e companheirismo.

Às empresas, Frimesa e Coopavel que gentilmente contribuíram com as matérias-primas necessárias para execução do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desta pesquisa (Edital Universal 479370/2008-7) e pela concessão de bolsa de mestrado.

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de culturas *starter* bacteriocinogênicas, sobre *Listeria monocytogenes* inoculada em linguiças coloniais durante a fermentação e secagem do produto. Para a seleção da cultura *starter* produtora de bacteriocina, 279 isolados de bactérias lácticas (BAL), obtidos de embutidos naturalmente fermentados, foram avaliados quanto à produção de substâncias antimicrobianas. Deste total, apenas quatro isolados de BAL produziram compostos antimicrobianos semelhantes à bacteriocinas. Os quatro isolados foram identificados como *Lactobacillus plantarum* e o isolado que apresentou as características metabólicas de importância tecnológica para produção de embutidos foi escolhido como cultura *starter*. O comportamento de *L. monocytogenes* em linguiças coloniais foi avaliado elaborando-se os seguintes tratamentos: controle, adicionado de *L. plantarum* não produtor de bacteriocina e adicionado de *L. plantarum* bacteriocinogênico, sendo que cada tratamento foi contaminado artificialmente com um *pool* de *L. monocytogenes* ($4 \log \text{UFC.g}^{-1}$). Durante a maturação das linguiças coloniais, foram realizadas análises físico-químicas, contagem de bactérias lácticas, contagem e detecção de *L. monocytogenes*. No tratamento inoculado somente com o *pool* de *L. monocytogenes* foi verificado o aumento da população do patógeno durante os 19 dias de processamento, sendo que o incremento na população foi de $2,01 \log \text{UFC.g}^{-1}$. As contagens apresentadas pelo tratamento inoculado somente com o *pool* de *L. monocytogenes*, foram significativamente ($P < 0,01$) superiores às exibidas pelos tratamentos inoculados com cultura *starter*. Nos tratamentos inoculados com cultura *starter* de *L. plantarum* produtor de bacteriocina e não produtor de bacteriocina foi verificada redução de aproximadamente $1,7 \log \text{UFC.g}^{-1}$ na população de *L. monocytogenes* durante a maturação de linguiças coloniais. No entanto, não foi verificada diferença estatística significativa ($P > 0,01$) entre os tratamentos adicionados de cultura *starter*. A redução da população do patógeno durante o processamento, foi atribuída a capacidade de acidificação das culturas *starter*, que promoveu redução do pH da massa cárnea para valores próximos a 4,7 durante a primeira semana da etapa de maturação. Os valores de pH do tratamento controle, permaneceram próximos a 6,07 durante a maturação das linguiças coloniais, diferindo significativamente ($P < 0,01$) dos tratamentos adicionados de cultura *starter*. Nas amostras naturalmente contaminadas com *L. monocytogenes* foi detectada a presença do patógeno até o 13º dia de maturação, nas amostras não inoculadas com cultura *starter*. Já nas amostras inoculadas com cultura *starter*, não foi verificada a presença do micro-organismo a partir do 7º dia de processamento.

Palavras chave: Linguiça colonial, *Lactobacillus plantarum*, atividade antimicrobiana, bacteriocina, *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

The objective of this study has been to evaluate the effect of bacteriocinogenic start culture against *Listeria monocytogenes* in naturally and artificially contaminated sausages during fermentation and drying. To select the bacteriocinogenic start culture, 279 lactic acid bacteria (LAB) isolated from naturally fermented sausages were screened for production of antimicrobial substances. Only four isolates produced antimicrobial compounds like bacteriocins. The four isolates were identified as *Lactobacillus plantarum* and the isolate that showed the desired metabolic characteristics to be used as starter culture, was selected. The behaviour of *L. monocytogenes* in sausages was evaluated preparing the following treatments: control, inoculated with bacteriocin-negative *L. plantarum* and bacteriocinogenic *L. plantarum*. Each treatment was contaminated artificially with a pool of *L. monocytogenes* ($4 \log \text{UFC.g}^{-1}$). During the maturation of sausages the following procedures were carried out: physical-chemical analysis, lactic acid bacteria counts, enumeration and detection of *L. monocytogenes*. In the treatment inoculated only with a pool of *L. monocytogenes* was verified the multiplication of the pathogen during the 19 days of maturation and the increase in the pathogen population was $2.01 \log \text{UFC.g}^{-1}$. The numbers of *L. monocytogenes* in the treatment inoculated only with the pathogen were significant ($P < 0.01$) higher than in the treatments inoculated with starter cultures. In the treatments inoculated with starter culture of bacteriocinogenic *L. plantarum* and *L. plantarum* bacteriocin-negative were observed a $1.7 \log \text{UFC.g}^{-1}$ reduction in levels of *L. monocytogenes* during the maturation of sausages. However, no significant differences ($P > 0.01$) were observed between the treatments inoculated with start culture. The reduction of pathogen population during the sausage processing was due to acidification capacity of starter cultures that lowered the pH values to 4,7 during the first week of maturation. The pH values of control treatment remained almost constant at 6.07 during the maturation, differing significantly ($P < 0.01$) from treatments inoculated with starter cultures. In naturally contaminated sausages, not inoculated with starter culture, the presence of pathogen was detected until the 13th day of maturation. On the other hand, the absence of the microorganism from 7th day of maturation was observed in the inoculated samples with starter culture.

Keywords: Sausage, *Lactobacillus plantarum*, antimicrobial activity, bacteriocin, *Listeria monocytogenes*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	INTERAÇÕES DETERMINADAS PELA AÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS E COCOS CATALASE POSITIVA DURANTE A FERMENTAÇÃO DE EMBUTIDOS CÁRNEOS.....	17
FIGURA 2 -	ETAPAS DA FORMAÇÃO DE COR EM CARNES CURADAS.....	21
FIGURA 3 -	ESQUEMA GERAL DA FERMENTAÇÃO DA GLICOSE PELAS BACTÉRIAS LÁTICAS.....	27
QUADRO 1-	PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS COMO CULTURAS STARTER EM EMBUTIDOS CÁRNEOS.....	33
FIGURA 4 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS.....	41
QUADRO 2-	FORMULAÇÃO PADRÃO DE LINGUIÇA COLONIAL.....	50
FIGURA 5 -	LINGUIÇAS COLONIAIS ACONDICIONADAS NA CÂMARA DE MATURAÇÃO.....	51
QUADRO 3 -	CONDIÇÕES UTILIZADAS NA CÂMARA CLIMATIZADA DURANTE FERMENTAÇÃO E SECAGEM DA LINGUIÇA COLONIAL.....	51
FIGURA 6 -	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DIRETA DE QUATRO ISOLADOS DE BAL FRENTE À <i>L. MONOCYTOGENES</i> ATCC 7644.....	57
FIGURA 7 -	ENSAIO DE DIFUSÃO EM POÇOS DO ISOLADO 323 FRENTE À <i>L. MONOCYTOGENES</i> 01.....	60
FIGURA 8 -	EVOLUÇÃO DO pH DURANTE MATURAÇÃO DE LINGUIÇA COLONIAL.....	64
FIGURA 9 -	EVOLUÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA DURANTE MATURAÇÃO DE LINGUIÇA COLONIAL.....	65
FIGURA 10 -	EVOLUÇÃO DA UMIDADE E PERDA DE PESO DURANTE MATURAÇÃO DE LINGUIÇA COLONIAL.....	67
FIGURA 11 -	EVOLUÇÃO DA CONTAGEM DE BAL DURANTE MATURAÇÃO DE LINGUIÇA COLONIAL.....	68
FIGURA 12 -	COMPORTAMENTO DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> DURANTE MATURAÇÃO DE LINGUIÇA COLONIAL.....	70
FIGURA 13 -	COMPORTAMENTO DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> E VALORES DE PH DURANTE MATURAÇÃO DE LINGUIÇA COLONIAL.....	73
FIGURA 14 -	NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>L. MONOCYTOGENES</i> DURANTE MATURAÇÃO DE LINGUIÇA COLONIAL NATURALMENTE CONTAMINADA.....	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	TRATAMENTOS REALIZADOS NO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	49
TABELA 2 -	LARGURA DO HALO DE INIBIÇÃO (mm) PRODUZIDO PELOS 30 CULTIVOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE EMBUTIDOS CÁRNEOS FRENTE AOS ISOLADOS DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	56
TABELA 3 -	LARGURA DO HALO DE INIBIÇÃO (mm) PRODUZIDO PELOS SOBRENADANTES DE BAL SUBMETIDOS A DIFERENTES TRATAMENTOS FRENTE AOS ISOLADOS DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	58
TABELA 4 -	CARACTERÍSTICAS DE BAL PRODUTORAS DE BACTERIOCINA ISOLADAS DE EMBUTIDOS CÁRNEOS PRODUZIDOS POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA.....	61
TABELA 5 -	PERFIL BIOQUÍMICO DOS ISOLADOS DE BAL PRODUTORES DE BACTERIOCINA.....	62
TABELA 6 -	RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE BAL DE ACORDO COM O PERFIL BIOQUÍMICO APRESENTADO.....	63

LISTA DE SIGLAS

ALOA - Ágar Listeria Ottavani e Agosti
AOAC - Association of Official Analytical Chemists
ANOVA – Análise de Variância
 a_w – Atividade de Água
APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC – American Type Culture Collection
Bac⁻ - Isolado não produtor de bacteriocina
Bac⁺ - Isolado produtor de bacteriocina
BAL – Bactérias Lácticas
BHI – Caldo Infusão Cérebro Coração
CDC – Centers for Disease Control and Prevention
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
ISO - International Organization for Standardization
MRS – de Man, Rogosa e Sharpe
TSA-YE – Agar Soja Triptona suplementado de 0,6% de extrato de levedura
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UFPR – Universidade Federal do Paraná

LISTA DE ABREVIATURAS

% (v/v) – Porcentagem volume por volume
°C - Graus Celsius
g – Gravidade
ml – Mililitros
m.s⁻¹ - Metros por segundo
mm – Milímetros
mM – Milimol
mol.l⁻¹ – Mol por litro
NaCl – Cloreto de sódio
N – Concentração Normal
ppm - Partes por milhão
rpm - Rotações por minuto
kDa – Quilo Dalton
µl – Microlitro
UA.ml⁻¹ - Unidades Arbitrárias de Bacteriocina por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVO GERAL.....	13
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 EMBUTIDOS FERMENTADOS.....	14
2.2 ELABORAÇÃO DE EMBUTIDOS FERMENTADOS	17
2.2.1 Matérias-primas cárneas	18
2.2.2 Gordura	18
2.2.3 Ingredientes de cura.....	19
2.2.3.1 Cloreto de sódio	19
2.2.3.3 Nitratos e Nitritos	20
2.2.3.4 Ascorbatos	22
2.2.3.5 Condimentos	23
2.2.4 Embutimento	23
2.2.5 Fermentação	23
2.2.6 Secagem	25
2.3 BACTÉRIAS LÁTICAS	25
2.3.1 Atividade antimicrobiana	27
2.3.1.1 Ácidos orgânicos	27
2.3.1.2 Peróxido de hidrogênio.....	28
2.3.1.3 Diacetil.....	29
2.3.1.4 Reuterina.....	29
2.3.1.5 Bacteriocinas.....	29
2.4 CULTURAS <i>STARTER</i>	33
2.4.1 Critérios de seleção de bactérias lácticas para uso como <i>starter</i> em embutidos fermentados	34
2.5 <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	35
2.6 INOCUIDADE DA LINGUIÇA COLONIAL	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE BACTERIOCINOGENÉTICA	40
3.1.1 Micro-organismos.....	40
3.1.2 Detecção da atividade antimicrobiana (<i>Spot- on- lawn</i>)	40
3.1.3 Detecção de bacteriófagos.....	42
3.1.4 Caracterização do composto antimicrobiano.....	42
3.1.5 Sensibilidade a enzimas proteolíticas e ao tratamento térmico.....	43
3.1.6 Quantificação da atividade bacteriocinogênica	43
3.2 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS PRODUTORAS DE BACTERIOCINA	44
3.2.1 Determinação da morfologia celular e coloração de Gram.....	44
3.2.2 Produção de catalase.....	44
3.2.3 Produção de gás carbônico (CO ₂).....	45
3.2.4 Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	45
3.2.5 Capacidade de acidificação.....	45
3.2.6 Capacidade de multiplicação em diferentes temperaturas.....	45
3.2.7 Capacidade de multiplicação em diferentes valores de pH.....	46
3.2.8 Tolerância ao cloreto de sódio (NaCl) e ao nitrito de sódio (NaNO ₂)	46

3.2.9	Produção de dextrana	46
3.2.10	Identificação bioquímica	46
3.3	PROCESSAMENTO DA LINGUIÇA COLONIAL.....	47
3.3.1	Matérias-primas e ingredientes	47
3.3.2	Preparação do inóculo das culturas de bactérias láticas.....	47
3.3.3	Preparação do inóculo de <i>L. monocytogenes</i>	48
3.3.4	Delineamento experimental.....	49
3.3.5	Processamento dos embutidos fermentados	49
3.4	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	51
3.4.1	Determinação do pH.....	52
3.4.2	Determinação da atividade de água (a_w).....	52
3.4.3	Determinação de umidade	52
3.4.4	Determinação da perda de peso	53
3.5	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	53
3.5.1	Contagem de bactérias láticas	53
3.5.2	Enumeração e detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	53
3.5.3	Detecção da atividade bacteriocinogênica de <i>L. plantarum</i> durante maturação das linguiças coloniais.....	54
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1	VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE BACTERIOCINOGÊNICA	56
4.2	CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS PRODUTORAS DE BACTERIOCINA	60
4.2.1	Identificação bioquímica	61
4.3	ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE MATURAÇÃO DA LINGUIÇA COLONIAL	63
4.3.1	pH.....	63
4.3.2	Atividade de água.....	65
4.3.3	Umidade e perda de peso	66
4.4	ALTERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS OCORRIDAS DURANTE O PROCESSAMENTO DE LINGUIÇA COLONIAL.....	68
4.4.1	Bactérias láticas	68
4.4.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	69
4.4.2.1	Comportamento de <i>L. monocytogenes</i> nos tratamentos artificialmente contaminados	69
4.4.2.2	Comportamento de <i>L. monocytogenes</i> nos tratamentos naturalmente contaminados.....	74
5	CONCLUSÕES	77
6	REFERENCIAS	78
ANEXO	89

1 INTRODUÇÃO

Embutidos cárneos fermentados são fabricados com carnes cruas que não passam por cocção ao longo do processamento e nem previamente ao consumo. Desse modo, a inocuidade e preservação desses produtos são dependentes da associação de vários fatores, incluindo a baixa atividade de água, presença de cloreto de sódio e nitrito de sódio, baixo pH e presença de substâncias antimicrobianas adicionadas ou formadas durante a maturação (OLIVEIRA; MENDONÇA, 2004).

A combinação dos obstáculos presentes nos produtos cárneos fermentados é suficiente para impedir o desenvolvimento de bactérias deteriorantes e da maioria dos patógenos, exceto *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 (JOHNSON *et al.*, 1988; TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ; MATTILA-SANDHOLM, 2003). Durante a fermentação e o processo de maturação de embutidos, a contaminação por *L. monocytogenes* tende a diminuir substancialmente. No entanto, a sobrevivência desse micro-organismo pode ocorrer em produtos fermentados mesmo em condições desfavoráveis (JOHNSON *et al.*, 1988).

A produção e consumo de embutidos cárneos fermentados crus na região sul do país, especialmente no Estado do Paraná é significativa. Inclusive em virtude disso, é que foi criado o padrão de identidade e qualidade para este tipo de produto (BRASIL, 2000), permitindo-se ter uma característica típica, mantendo-se a denominação colonial. Acontece, porém, que a inexistência de valores mínimos de pH e máximo de atividade de água podem favorecer que patógenos se desenvolvam tornando duvidosa a inocuidade deste produto. Estudos têm demonstrado que o gênero *Listeria* é encontrado facilmente em produtos cárneos fermentados crus e produzidos artesanalmente, o que pode tornar este tipo de produto um grande problema para a saúde pública.

A utilização de bactérias láticas produtoras de bacteriocinas pode contribuir na redução da ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos fermentados. Vários estudos têm demonstrado a capacidade de produção de bacteriocinas por cepas de *Pediococcus* e *Lactobacillus*, que exibem atividade antimicrobiana frente à *Listeria monocytogenes* (SCHILLINGER; LÜCKE, 1989; HARRIS *et al.*, 1989).

1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da adição de culturas *starter* bacteriocinogênicas, isoladas de embutidos produzidos por fermentação espontânea, sobre *Listeria monocytogenes* em linguiças coloniais durante a fermentação e secagem do produto.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a capacidade de produção de bacteriocinas *in vitro* e *in situ* das culturas de bactérias lácticas isoladas de salames e linguiças coloniais frente a *L. monocytogenes*.
- Caracterizar e identificar culturas de bactérias lácticas bacteriocinogênicas isoladas de embutidos coloniais, visando à seleção de cepas com características tecnológicas apropriadas, para a utilização como culturas *starter* na fabricação de linguiça colonial;
- Produzir linguiça colonial com cultura *starter* bacteriocinogênica, isolada de embutidos produzidos por fermentação espontânea;
- Avaliar as alterações físico-químicas e microbiologias das linguiças coloniais produzidas com cultura *starter* durante o processo de fermentação e secagem.
- Verificar a estabilidade da linguiça colonial produzida de acordo com a legislação nacional vigente frente ao desenvolvimento de *L. monocytogenes*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EMBUTIDOS FERMENTADOS

Em tempos imemoriais o homem desconhecia a existência dos micro-organismos, porém sabia que os alimentos, se não consumidos rapidamente, se deterioravam. Buscando evitar a perda deste alimento excedente foi levado a desenvolver diferentes formas de conservação. Através da observação, verificou-se que o tempo de conservação da carne era prolongado toda vez que era moída, misturada com sal e ervas aromáticas (MOORE, 2004). Assim, surgiram os embutidos há, aproximadamente, 1500 a.C, com os produtos fermentados tendo como berço a região Mediterrânea, cujo clima (temperatura e umidade relativa) é muito favorável para a sua maturação (LÜCKE, 1994). Inicialmente, os processos de fermentação eram, principalmente, utilizados para preservar alimentos de origem vegetal e animal. Porém, com o surgimento de outros processos de preservação, como a esterilização e a utilização da cadeia do frio, a fermentação perdeu sua importância como método de conservação nos países industrializados e passou a ser uma classe independente de gênero alimentício, principalmente pelas características peculiares de sabor, aroma e textura (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Os países que apresentam maior produção e consumo per capita de embutidos fermentados são Alemanha, Itália, Espanha e França. Porém, nos últimos anos, estes produtos tornaram-se cada vez mais populares em países como Estados Unidos, Austrália, Grã-Bretanha, Brasil e Japão (FERNÁNDEZ *et al.*, 2000).

No Brasil, a produção de embutidos fermentados originou-se a partir dos conhecimentos e processos de produção trazidos pelos imigrantes italianos que, ao se instalarem na região sul, encontraram condições climáticas favoráveis e iniciaram a produção artesanal, dando origem a pequenas fábricas. A produção nacional de embutidos fermentados compõe uma fatia significativa do mercado de produtos cárneos. Estima-se que a produção diária seja entre 110 e 120 toneladas (TERRA; FRIES; TERRA, 2004; MACEDO, 2005).

Os embutidos fermentados, como os salames, são caracterizados pelas suas propriedades sensoriais, nutricionais, químicas e microbiológicas. Dois fatores básicos tornam este produto diferente dos demais embutidos: baixo teor de umidade e presença de ácido láctico, que confere o sabor característico (GRIS *et al.*, 2002).

O processo tecnológico que define os embutidos fermentados compreende a moagem da carne *in natura* e mistura da gordura picada juntamente com o sal, nitrito e/ou nitrato, açúcar e especiarias, seguida do embutimento, período de fermentação e do processo de secagem (HUGAS; MONFORT, 1997).

Existe uma grande variedade de embutidos fermentados produzidos por diferentes técnicas, embora o processo produtivo seja a combinação de fermentação e secagem. As variações do processo incluem a composição da matéria-prima cárnea, grau de moagem, diâmetro da peça, defumação, uso de bolores, tempo de secagem, entre outros. Na Alemanha, são produzidos mais de 350 tipos de salames fermentados (FERNÁNDEZ *et al.*, 2000). No Brasil, a Instrução Normativa nº22 de 31 de julho de 2000 define os padrões de identidade e qualidade de oito tipos de salames e de linguiça colonial (BRASIL, 2000).

Os principais objetivos da fermentação e do processo de secagem são: (1) formação da coloração vermelha típica dos produtos cárneos; (2) formação de compostos responsáveis pelo sabor e aroma; (3) desenvolvimento da textura e fatiabilidade; (4) inibição de micro-organismos patogênicos; (5) aumento do tempo de prateleira. Estes objetivos são atingidos por um complexo de reações físicas, químicas e microbiológicas (BUCKENHÜSKES, 1993). As bactérias lácticas são os principais micro-organismos responsáveis pelos efeitos desejáveis, mas outras bactérias, como os cocos catalase positivos (*Staphylococcus*, *Kocuria*), leveduras (*Debaromyces*) e fungos (*Penicillium*) normalmente estão envolvidos na geração e estabilidade das propriedades sensoriais desejadas (LÜCKE, 2000).

As leveduras metabolizam o ácido láctico reduzindo a acidez do embutido e melhoram o sabor por possuírem enzimas proteolíticas e lipolíticas. Os mofos também atuam sobre o sabor, devido ao seu arsenal enzimático, apesar de não serem adicionados na massa e sim aplicados sobre a tripa. Nessa localização, desempenham particular ação evitando a rápida desidratação e dificultando a penetração do oxigênio e luz, reduzindo a ocorrência de processos oxidativos (TERRA, 1998; PRÄNDL, 1994).

Tem-se demonstrado que as espécies de bactérias lácticas comumente isoladas de salames produzidos por diferentes tecnologias de produção são: *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus* e *L. plantarum* (PAPAMANOLI *et al.*, 2003). A quantidade desses micro-organismos aumenta durante os primeiros dias do processo fermentativo e, durante o processo de secagem, os valores se mantêm entre 7 e 9 log UFC. g⁻¹ (TALON; LEROY; LEBERT, 2007).

As bactérias lácticas são responsáveis pela rápida fermentação dos carboidratos adicionados intencionalmente à massa cárnea produzindo ácido láctico via Embden-Meyerhof, resultando num decréscimo do pH (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). Os efeitos da redução do pH e as interações determinadas pela ação das bactérias lácticas podem ser visualizados na Figura 1. Os principais resultados decorrentes da produção de ácido láctico são:

- a) Atinge-se o ponto isoelétrico das proteínas (miofibrilares) musculares, transformando a emulsão original em gel e ocasionado a diminuição da capacidade de retenção de água, com conseqüente desidratação do embutido, conferindo uma textura firme e fatiabilidade do produto final (HAMMES; BANTLEON; MIN, 1990).
- b) O pH baixo é responsável pela formação da coloração rosa-avermelhada estável, uma vez que favorece a redução do nitrito a óxido nítrico (SANTOS *et al.*, 1998)
- c) Além do baixo pH, os baixos valores da atividade de água (a_w), juntamente com a presença de concentrações moderadas de cloreto de sódio (em torno de 3%) e de outros aditivos, geram uma condição ambiental desfavorável ao desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes e patogênicos na massa cárnea (MIRALLES; FLORES; PEREZ-MARTINEZ, 1996), fazendo com que o produto tenha uma grande estabilidade.

Apesar de estarem presentes em quantidade inferior às bactérias lácticas (6 a 8 log UFC.g⁻¹ no final do processo de maturação), os cocos catalase-positivos desempenham um importante papel na formação das características sensoriais do produto (TALON; LEROY; LEBERT, 2007).

Várias espécies de esfafilococos catalase-positivos são comumente isoladas de salames fermentados, como: *Staphylococcus saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. equorum*, *S. succinus*, *S. warnei*

(SAMELIS *et al.*, 1998; COPPOLA *et al.*, 2000; MAURIELLO *et al.*, 2004; DROSINOS *et al.*, 2005).

Os *Staphylococcus* não patogênicos desempenham papel fundamental na fermentação dos embutidos, sendo responsáveis pela formação do aroma, inibição da rancidez pela produção da catalase que desdobra o peróxido de hidrogênio e redução do nitrato a nitrito (LEISTNER, 1990), conforme pode ser observado na Figura 1.

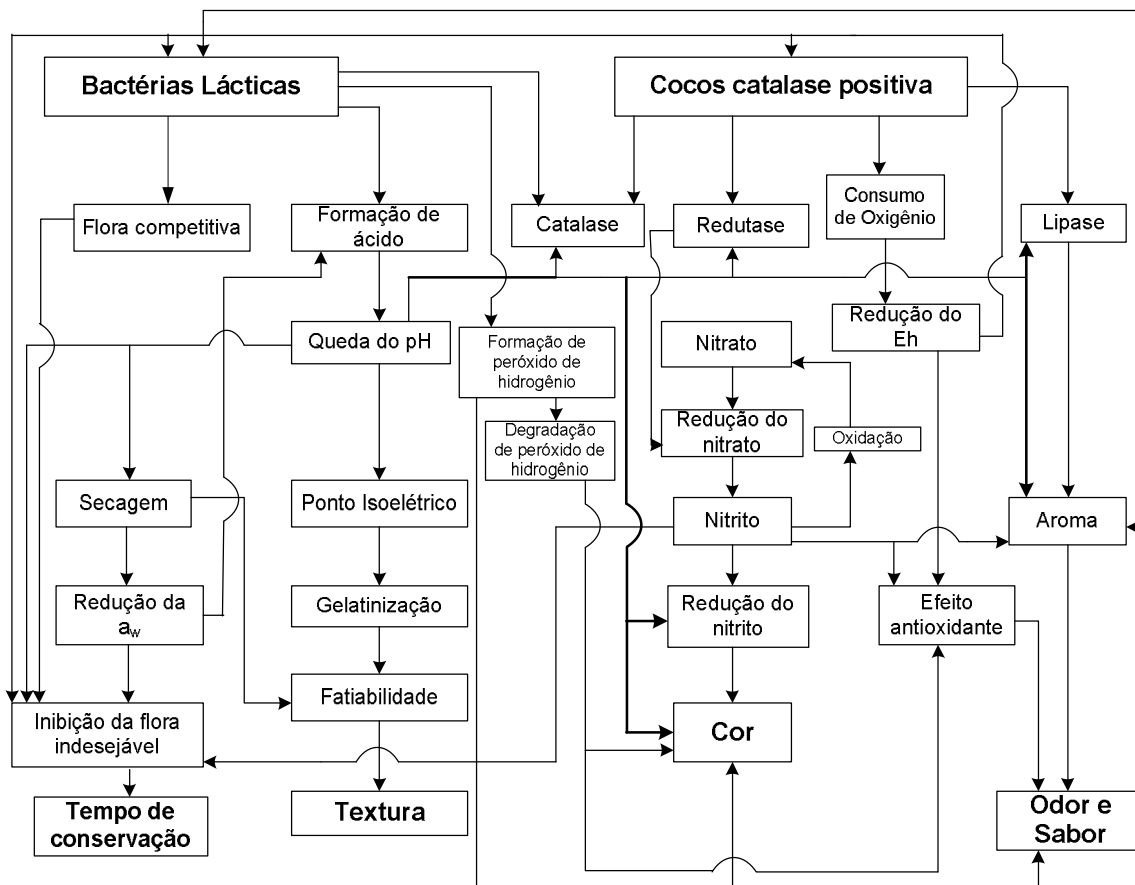


FIGURA 1 - INTERAÇÕES DETERMINADAS PELA AÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E COCOS CATALASE POSITIVA DURANTE A FERMENTAÇÃO DE EMBUTIDOS CÂRNEOS

FONTE: BUCKENHÜSKES (1993)

2.2 ELABORAÇÃO DE EMBUTIDOS FERMENTADOS

De uma forma resumida, a fabricação de embutidos fermentados ocorre em duas etapas distintas: na etapa inicial, ocorre a fermentação com o desenvolvimento

das características sensoriais do produto e em uma etapa final a desidratação que, além de reforçar algumas propriedades sápidas, reduz a atividade de água inibindo a ação de micro-organismos deteriorantes (TERRA, 1998).

2.2.1 Matérias-primas cárneas

Para evitar problemas no início da fermentação, as carnes utilizadas deverão ter pH normal (5,5 - 5,8) e uma baixa população de micro-organismos indesejáveis, como por exemplo, enterobactérias (CAMPAGNOL, 2007).

De acordo com BARBUTI e PAROLARI (2002), carnes com pH elevado do tipo DFD (escura, firme e seca) podem prejudicar a diminuição do pH no embutido, favorecendo a multiplicação de bactérias deteriorantes. Por outro lado, o uso de grandes quantidades de carne PSE (pálida, mole e exsudativa), que possuem baixo pH, pode acarretar em defeito de dessecação no produto final por uma rápida perda de umidade (PRÄNDL *et al.*, 1994).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salames estabelece que a quantidade mínima de carne suína no salame deva ser 60%, com exceção do salame hamburguês, cujo teor mínimo permitido é 50% (BRASIL, 2000).

2.2.2 Gordura

A gordura está intimamente ligada ao sabor, aroma e textura dos embutidos. É constituída por diferentes ácidos graxos, cujos graus de insaturação respondem pelo seu comportamento. Quando aumenta a proporção de ácidos graxos insaturados, ocorre uma redução da temperatura de fusão da gordura animal, liquefazendo-se à temperatura ambiente. Neste sentido, a gordura utilizada para produção de embutidos deve ser da região dorsal (toucinho), cuja proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados permite o seu estado sólido, à temperatura ambiente (TERRA ;TERRA; TERRA, 2004).

2.2.3 Ingredientes de cura

Embora uma grande variedade de compostos possam ser utilizados na cura de produtos cárneos, os ingredientes básicos são o sal (cloreto de sódio), o açúcar e o nitrito (PARDI, 1996 ; PEARSON; GILLETT, 1996).

2.2.3.1 Cloreto de sódio

Além de potencializar o sabor, o sal atua desidratando e modificando a pressão osmótica, inibindo o crescimento microbiano (PEARSON; GILLETT, 1996), sendo um dos primeiros obstáculos ao crescimento de micro-organismos indesejáveis. Atua, também, na solubilização e difusão das proteínas miofibrilares da carne formando um gel entre as partículas de carne e a gordura (TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ; MATTILA-SANDHOLM, 2003).

Contudo, o uso isolado de sal resulta em produtos secos, de textura inadequada e baixa palatabilidade, além de provocar a oxidação do pigmento mioglobina produzindo coloração escura (metamioglobina), que não é aceita pelo consumidor (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). Por estas razões, o sal é utilizado combinado com açúcar e nitrito e/ou nitrato. Uma pequena parcela de produtos é curada apenas com a adição de cloreto de sódio (PEARSON e GILLETT, 1996).

Usualmente os valores de cloreto de sódio adicionados à massa do embutido estão entre 2,4% e 3%, o que possibilita obter valores de atividade de água inicial entre 0,96 e 0,97. Esses valores de a_w favorecem o crescimento de bactérias lácticas e micrococos, que irão contribuir para a fermentação do produto (MACEDO, 2005).

2.2.3.2 Açúcar

Os açúcares na forma de mono ou dissacarídeos são adicionados em quase todos os produtos cárneos em pequenas quantidades (0,05 a 0,5%) com objetivo de melhorar o sabor e mascarar o amargor dos sais de cura (PRÄNDL, 1994). Também são fonte energética para bactérias láticas e cocos catalase positiva naturalmente presentes na carne ou provenientes de culturas adicionadas.

O açúcar cria condições redutoras durante o processo de cura, o que, provavelmente, faz com que as carnes curadas não desenvolvam aroma de oxidado e também influencia a cor das carnes curadas, porque estabiliza o Fe^{+2} (TERRA;FRIES;TERRA, 2004).

2.2.3.3 Nitratos e Nitritos

O nitrato de sódio ($NaNO_3$) e o nitrito de sódio ($NaNO_2$) são usados, em carnes curadas, há séculos. Os nitratos foram usados pela primeira vez na cura da carne de forma acidental, resultado de sua presença como impureza no sal, e observou-se que estabilizam a cor da carne curada (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

O nitrato não possui atividade antioxidante, mas torna-se funcional quando da sua redução para nitrito, atuando como reservatório de nitrito, que é o responsável pelas reações de cor nos produtos curados (SEBRANEK; BACUS, 2007). O nitrato é utilizado na fabricação de embutidos fermentados com longo tempo de maturação. A redução de nitrato à nitrito é realizada por bactérias da família *Staphylococcaceae* e *Micrococcaceae*, que asseguram a quantidade suficiente de nitrito ao longo de todo o período de maturação (MACEDO, 2005; FONTÁN *et al.*, 2007).

As funções importantes do nitrito incluem: estabilização da cor, desenvolvimento do *flavor* característico dos produtos curados, inibição da oxidação lipídica e ação antimicrobiana frente às bactérias deteriorantes e patogênicas, especialmente o *Clostridium botulinum* (PRICE; SCHWEIGERT, 1994). Em altas dosagens, o nitrito é eficaz contra *S. aureus* e sua eficácia aumenta à medida que o

pH diminui. No entanto, é ineficaz contra enterobactérias, incluindo *Salmonella*, e bactérias lácticas (JAY, 2005).

As concentrações de nitrito necessárias para ocorrência dos diversos efeitos nos produtos cárneos são de 30 a 50 ppm para desenvolvimento de cor; de 20 a 40 ppm para desenvolvimento de aroma, de 80 a 150 ppm para o efeito conservante (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005) e entre 20 e 50 ppm para o efeito antioxidante, sendo que esses valores dependem do tipo de produto cárneo (TERRA; CHICOSKI, FREITAS, 2006).

A formação da cor e sua estabilidade são importantes características sensoriais dos produtos cárneos e é um atributo no processo de decisão de compra e aceitabilidade dos consumidores (ZHANG; KONG; XIONG, 2007). A carne apresenta apenas dois pigmentos cujas propriedades influem efetivamente na cor apreciada, esses pigmentos são a mioglobina (Mb) e a hemoglobina (Hb) (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Adicionados os sais de cura à massa cárnea, uma série de reações ocorrerá, resultando na formação de óxido nítrico (NO), conforme a Figura 2. A formação da cor em produtos cárneos curados é um processo lento e complexo, que envolve ação microbiana, enzimática e química e é dependente do pH, quantidade de mioglobina, potencial de oxi-redução, temperatura, distribuição do sal de cura e umidade relativa (CHASCO; LIZASO; BERIAIN, 1996).

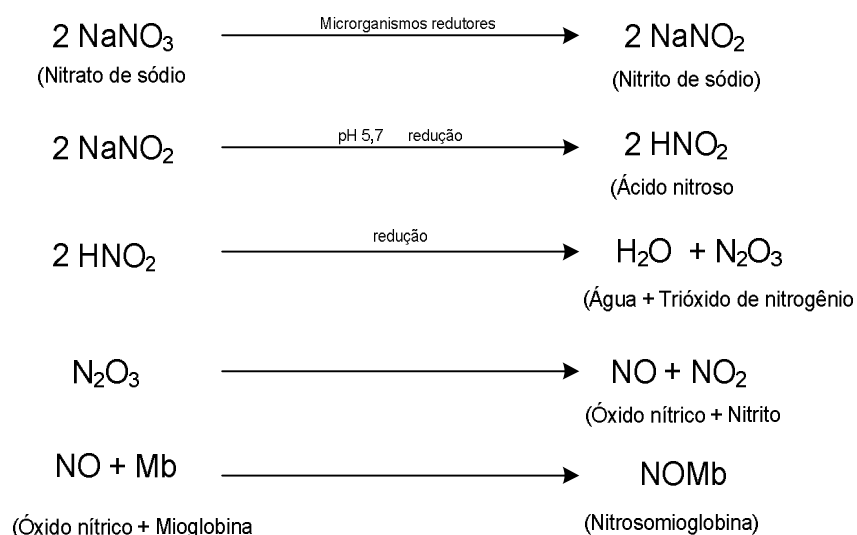


FIGURA 2 - ETAPAS DA FORMAÇÃO DE COR EM CARNES CURADAS

FONTE: TERRA (1998) e HONIKEL (2008)

O nitrito é convertido, na carne, em ácido nitroso, o qual é reduzido a óxido nítrico (NO). O NO reage com a Mb formando a nitrosomioglobina (NOMb), pigmento vermelho característico dos produtos cárneos curados não cozidos, como salames e presuntos crus.

A cor final do produto curado depende da mistura de quantidades convenientes dos sais de cura com a mioglobina, existente na carne. Diminuição da quantidade de carne utilizada na fabricação do embutido, buscando reduzir custos de fabricação, significa falta de mioglobina, necessitando uma suplementação através do uso de sangue estabilizado (hemoglobina) ou corantes (TERRA, 1998).

Apesar dos inúmeros benefícios e das várias funções que o nitrito desempenha nos produtos cárneos, a segurança deste produto para a saúde humana tem sido questionada. O nitrito pode reagir com aminas secundárias e aminoácidos naturalmente presentes na carne formando as nitrosaminas, compostos considerados carcinogênicos (ZHANG; KONG; XIONG, 2007). Entretanto, a formação das nitrosaminas pode ser reduzida pela adição de ácido ascórbico e seus sais e culturas *starter* (TERRA, 1998).

Somente 5% a 20% do nitrito adicionado podem ser encontrados como nitrito residual no produto final, a maior parte (20% a 30%) é ligada a proteínas não heme. Aproximadamente, 5% a 15% são usados para a formação de nitrosomioglobina, 1% a 10% é convertido em nitrato, 5% a 15% reagem com grupos sulfidrílicos, 1% a 15% é encontrado na fração lipídica e 1% a 5% na forma gasosa (TERRA; FRIES; TERRA, 2004; HONIKEL, 2008).

2.2.3.4 Ascorbatos

O ácido ascórbico e o ácido eritórbito, assim como seus sais, são normalmente utilizados como coadjuvantes da cura (ORDÓÑEZ, 2005). O ácido ascórbico funciona como um agente redutor, antioxidante e como agente sequestrador em determinados alimentos (PARDI *et al.*, 1996). Originalmente eram usados para melhorar a cor da carne, e sua ação parece residir na capacidade para reduzir a metamioglobina em mioglobina e em potencializar a produção de óxido nítrico a partir de nitritos. No entanto, o mais importante dos efeitos dos ascorbatos

seja sua ação bloqueadora do desenvolvimento de nitrosaminas em carnes curadas (PRICE; SCHWEIGERT, 1994 ; ORDÓÑEZ, 2005).

2.2.3.5 Condimentos

Os condimentos mais utilizados são a pimenta branca e a pimenta preta e, em menor quantidade, a noz moscada e alho (MACEDO, 2005). Contribuem principalmente para o desenvolvimento do sabor e do aroma típico dos produtos fermentados, mas tem sido demonstrado que possuem atividade antimicrobiana e antioxidante (OLIVEIRA; MENDONÇA, 2004). Alecrim, orégano, sálvia, cravo-da-índia e pimenta da jamaica são alguns dos condimentos com significativas propriedades antioxidantes em produtos alimentícios (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

2.2.4 Embutimento

Após a moagem, a matéria-prima é misturada com os demais ingredientes e é embutida em tripas de diâmetro variável (TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ, MATTILA-SANDHOLM, 2003). Durante o embutimento é muito importante retirar o oxigênio da massa cárnea, já que este interfere no desenvolvimento da cor e do sabor do produto final. As tripas utilizadas nesta etapa podem ser tanto naturais como artificiais, fabricadas à base de colágeno. Elas devem permitir a perda de água do embutido e ter elasticidade para tolerar a retração do envoltório que se produz durante a dessecação do produto (CAMPAGNOL, 2007).

2.2.5 Fermentação

Após o embutimento, o produto é levado à câmara de maturação, onde se controla a temperatura, a umidade relativa e a velocidade do ar. Durante a etapa de

fermentação, a temperatura da câmara deve estar entre 18 e 26°C, a umidade relativa deve ser mantida 4% menor do que a atividade de água no interior do salame, isto é, em torno de 85% a 90%, e a velocidade do ar controlada em cerca de 0,4 m.s⁻¹ durante 2 a 4 dias (TERRA;TERRA;TERRA, 2004; CAMPAGNOL, 2007). Nessa fase ocorrem dois fenômenos de grande importância para o desenvolvimento das características sensoriais do produto: a redução dos nitratos e a fermentação dos açúcares (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

A redução dos nitratos é realizada pelas bactérias da família Staphylococcaceae e Micrococcaceae, entre as primeiras 8 a 16 horas, pois ainda os níveis de ácido são suficientemente baixos para que não se iniba sua atividade redutora (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). As bactérias lácticas, ao utilizarem os carboidratos presentes na formulação cárnea, geralmente a glicose, produzem ácido láctico, promovendo a diminuição do pH das proteínas da carne até seu ponto isoelétrico, diminuindo a sua capacidade de retenção de água. Isto auxilia a perda de água do embutido durante a etapa de secagem (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

A temperatura, a umidade relativa e a velocidade de circulação do ar são parâmetros que devem ser controlados com precisão para se obter uma fermentação adequada (LÜCKE, 1994). Temperaturas de fermentação elevadas podem ocasionar alguns problemas tecnológicos em relação à estabilidade microbiológica do produto. A acidificação rápida proporciona sabor e aroma forte e a temperatura alta pode promover a fusão da gordura utilizada na formulação do produto. Além disso, o principal problema seria o desenvolvimento e produção de toxina de *S. aureus* dadas as condições de temperatura, concentração de sal e atividade de água (NASSU, 1999). Por outro lado, se a umidade relativa estiver muito baixa ou a taxa de circulação do ar muito alta (maior que 0,5 m.s⁻¹), poderá ocorrer uma desidratação excessiva e se formar uma crosta superficial no embutido, o que impedirá a eliminação de água do interior do produto, favorecendo o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis (TERRA; TERRA; TERRA, 2004; CAMPAGNOL, 2007).

A fermentação pode ser espontânea, em que a microbiota natural da matéria-prima e contaminantes ambientais são os responsáveis pelas transformações, ou iniciada com a adição de culturas *starter* (BUCKENHÜSKES, 1993). O uso de *starter* contribui com o controle do processo fermentativo,

diminuição do tempo de produção e possibilita obter produtos inócuos ao consumidor (LEROY; De VUYST, 2004).

2.2.6 Secagem

A secagem do embutido é uma etapa que também deve ser muito bem controlada. Se as condições de secagem forem muito drásticas, ocorrerá formação de uma crosta seca na superfície que contribuirá para a manutenção da umidade no interior do produto, o que pode causar problemas de conservação devido à alta atividade de água da porção central do salame (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000).

Os embutidos são submetidos a condições de temperatura entre 12 a 14°C e umidade relativa entre 75% a 85% (ORDÓÑEZ, 2005). Já PRICE e SCHWEIGERT (1994) citam temperaturas entre 10 e 17°C e umidade relativa entre 65 e 85% para a dessecação do produto. Durante a secagem os embutidos perdem de 30 a 40% do seu peso inicial, sendo importante que a perda de umidade seja gradual e uniforme. O tempo de secagem varia conforme o tipo do embutido e o calibre das peças.

Durante a etapa de secagem ocorre a hidrólise enzimática das proteínas e dos lipídeos, originando substâncias que contribuem para o sabor e aroma do produto final (ORDÓÑEZ, 2005).

2.3 BACTÉRIAS LÁTICAS

Este grupo é composto de gêneros que incluem *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (JAY, 2005).

As bactérias lácticas apresentam-se na forma de cocos ou bacilos, são Gram-positivos, não formadores de esporos, catalase e oxidase negativa, anaeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerófilos e estritamente fermentativos, produzindo

ácido láctico como único ou principal produto final do metabolismo dos carboidratos (AXELSSON, 2004).

As bactérias lácticas são geralmente mesófilas, porém conseguem desenvolver-se em uma ampla faixa de temperatura entre 5°C e 45°C. Da mesma forma, a maioria das cepas é metabolicamente ativa em uma ampla faixa de pH, sendo observado atividade para algumas cepas em pH extremo de 9,6 e para outras em pH de 3,2.

Todas as bactérias ácido-lácticas produzem ácido láctico a partir de hexoses, obtendo a energia pela fosforilação de substratos, pois não possuem a cadeia transportadora de elétrons e o ciclo de Krebs. O ácido láctico produzido pode ser o L(+) ou o D (-), sendo que este ocorre com menos frequência, ou uma mistura racêmica dos isômeros (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

As rotas pelas quais as hexoses são metabolizadas dividem as bactérias lácticas em dois grupos, as homofermentativas e as heterofermentativas. As bactérias homoláticas metabolizam os carboidratos pela via Embden-Meyerhof-Parnas gerando dois moles de lactato por mol de glicose. Todos os membros dos gêneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Vagococcus* são homofermentativos, assim como alguns *Lactobacillus*. As bactérias heteroláticas utilizam a via das pentoses ou via das hexoses monofosfato, produzindo quantidades equimolares de lactato, gás carbônico (CO₂) e etanol. São classificados como heterofermentadores os gêneros: *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* e alguns *Lactobacillus* (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; AXELSSON, 2004; JAY, 2005). Um esquema geral da fermentação da glicose pelas bactérias lácticas está apresentado na Figura 3.

Sob certas condições, as bactérias lácticas utilizam vias alternativas para a metabolização do piruvato do que a redução para ácido láctico, produzindo outros compostos importantes como o diacetil, acetato, gás carbônico (CO₂), água oxigenada (H₂O₂) e acetoína. Diferentes espécies de bactérias utilizam diferentes vias metabólicas, dependendo das condições e da capacidade enzimática bacteriana (AXELSSON, 2004; HUTKINS, 2006).

2.3.1 Atividade antimicrobiana

Os principais mecanismos pelos quais as bactérias lácticas inibem os micro-organismos patogênicos e deteriorantes são a produção dos ácidos láctico e acético e possivelmente bacteriocinas. Outros metabólitos como diacetil, peróxido de hidrogênio, reuterina e gás carbônico têm sua aplicação antimicrobiana limitada em produtos cárneos, por interferirem nas propriedades sensoriais (peróxido de oxigênio, CO₂ e diacetil) ou por serem produzidos em quantidades muito pequenas (reuterina) (LÜCKE, 2000).

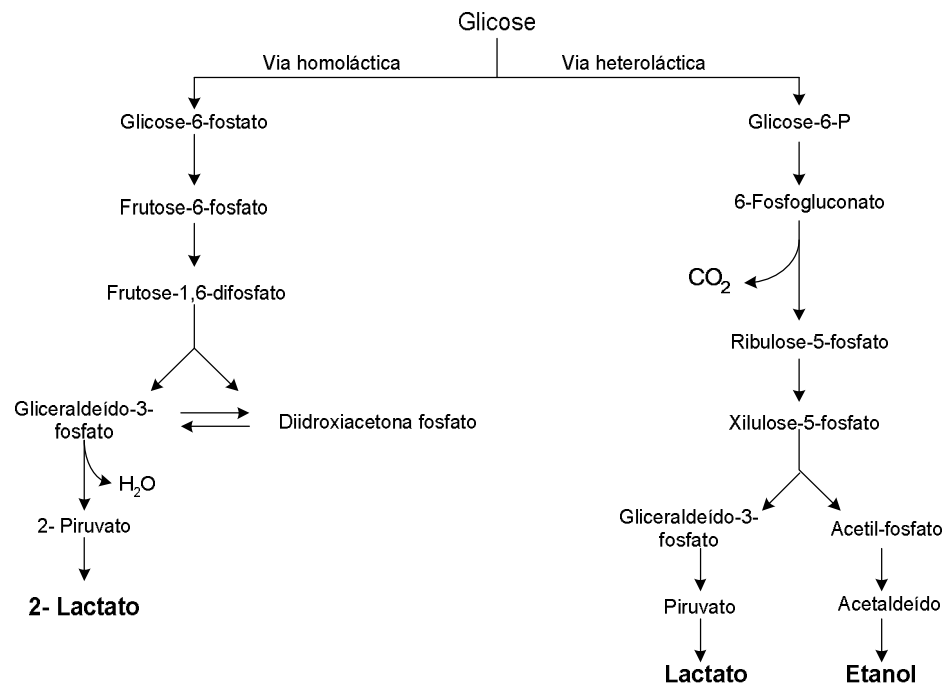


FIGURA 3- ESQUEMA GERAL DA FERMENTAÇÃO DA GLICOSE PELAS BACTÉRIAS LÁTICAS
 FONTE: Adaptado de CAPLICE; FITZGERALD,(1999) e AXELSSON (2004)

2.3.1.1 Ácidos orgânicos

O ácido láctico, produto característico da fermentação por bactérias lácticas, pode reduzir o pH em níveis que o desenvolvimento de micro-organismos

deteriorantes (*Pseudomonas*), patogênicos (*Salmonella*) e toxigênicos (*S. aureus*, *Clostridium botulinum*) é inibido (HOLZAPFEL; GEINSEN; SCHILLINGER, 1995).

Acredita-se que o baixo pH extracelular provoca a acidificação do citoplasma reduzindo as atividades metabólicas celulares. A natureza lipofílica dos ácidos não-dissociados permite a difusão pela membrana celular, causando desnaturação crescente da membrana e das enzimas de transporte (AMMOR; MAYO, 2007).

O efeito inibitório dos ácidos não-dissociados é de 60 a 100 vezes maior que a sua forma dissociada. A atividade antimicrobiana de cada ácido sob mesmas condições (concentração molar e pH) não é igual. O ácido acético ($pK_a = 4,75$) apresenta maior potencial de inibição do que o ácido láctico ($pK_a = 3,1$), por possuir maior constante de ionização (HELANDER; WRIGHT; MATTILA-SANDHOLM, 1997).

A rápida redução do pH para valores inferiores a 5,3 durante a fermentação do embutido cárneo é suficiente para inibir o desenvolvimento de *Salmonella* e *S. aureus* (HOLZAPFEL; GEINSEN; SCHILLINGER, 1995).

2.3.1.2 Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido por certas bactérias lácticas em presença de oxigênio molecular juntamente com lactato, piruvato e NADH por enzimas flavinas (HOLZAPFEL; GEINSEN; SCHILLINGER, 1995).

De acordo com CAPLICE E FITZGERALD (1999), o H_2O_2 pode acumular-se e inibir o crescimento de alguns micro-organismos. Esta inibição ocorre pelo elevado efeito oxidante na membrana lipídica e nas proteínas celulares. Assim como os outros metabólitos, o peróxido de hidrogênio é tolerável, dependendo do tipo de produto e situação. Em produtos cárneos, o H_2O_2 atua negativamente na coloração do produto formando a coeglobina (pigmento esverdeado) (TERRA; FRIES; TERRA 2004).

2.3.1.3 Diacetil

O diacetil é produto do metabolismo do citrato e é responsável pelo aroma da manteiga e de outros produtos lácteos fermentados. Muitas bactérias lácticas incluindo *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactobacillus* podem produzir diacetil (CAPLICE; FITZGERALD, 1999). O diacetil apresenta ação antimicrobiana em concentrações entre 300 a 1000 ppm e por apresentar aroma de manteiga em valores inferiores a 4 ppm, sua aplicação em produtos cárneos é limitada (HELANDER; WRIGHT; MATTILA-SANDHOLM, 1997).

2.3.1.4 Reuterina

A reuterina é produzida em anaerobiose pelo *Lactobacillus reuteri* em meio contendo glicose e glicerol ou gliceraldeído. Possui ação antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e leveduras. Provavelmente sua ação ocorra pela inibição da enzima ribonucleotídeo-redutase (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

2.3.1.5 Bacteriocinas

As bacteriocinas podem ser definidas como um grupo de peptídeos ou proteínas de potente ação antimicrobiana contra micro-organismos relativamente próximos. As bacteriocinas são ribossomicamente produzidas como metabólitos secundários e liberados no meio extracelular. A maioria delas são moléculas catiônicas pequenas (30-60 resíduos de aminoácidos) formando hélices anfifílicas termoestáveis (HOLZAPFEL; GEISEN; SCHILLINGER, 1995; CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Em geral, as bacteriocinas exercem seus efeitos inibitórios pela formação de poros na membrana celular, desestabilizando e alterando a permeabilidade das

células sensíveis (LÜCKE, 2000; CINTAS *et al.*, 2001). Dessa forma, a atividade inibitória desses metabólitos está restrita a bactérias Gram-positivas, visto que as bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa impermeável à maioria das moléculas (ABEE *et al.*, 1995).

Métodos de conservação não-térmicos, como o uso de ultra-alta pressão ou campo elétrico pulsado, podem ser utilizados com o objetivo de alterar a permeabilidade da membrana externa das bactérias Gram-negativas. Além disso, a utilização de agentes quelantes como EDTA e citrato podem sensibilizar bactérias Gram-negativas, como *Salmonella* à ação de bacteriocinas (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

As bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre bactérias Gram-positivas. Dentre os micro-organismos inibidos pela ação das bacteriocinas encontram-se importantes patógenos alimentares como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (SCHILLINGER; GEISEN; HOLZAPFEL, 1996).

Segundo DRIDER (2006), as bacteriocinas estão distribuídas em 3 classes de acordo com suas características bioquímicas e genéticas:

a) Classe I (lantibióticos): é constituída por peptídeos termoestáveis de baixo peso molecular (19 a 38 resíduos de aminoácidos) que apresentam em sua composição aminoácidos raramente encontrados na natureza como lantionina (COTTER; HILL; ROSS, 2005). A principal representante desta classe é a nisina, produzida por algumas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

b) Classe II: é composta por pequenos peptídeos (< 10 kDa) termoestáveis. Geralmente apresentam uma estrutura helicoidal anfifílica, a qual permite sua inserção na célula alvo, promovendo a despolarização da membrana e morte celular (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008). As bacteriocinas pertencentes a esta classe encontram-se subdivididas em:

- Classe II a: é composta por bacteriocinas que apresentam alta especificidade contra *L. monocytogenes*. Seus representantes possuem 37 a 48 resíduos de aminoácidos. Esta classe também é conhecida por família das pediocinas, porque a pediocina foi a primeira bacteriocina a ser identificada e a mais estudada (AYMERICH; HUGAS; MONFORT, 1998). Estudos têm relatado a inibição

de *L. monocytogenes* por pediocina ou pela utilização de culturas produtoras de pediocina em embutidos fermentados (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

- Classe II b: é constituída por bacteriocinas que requerem a atividade combinada de dois peptídeos, com um mecanismo de ação que envolve a dissipação do potencial de membrana e diminuição da concentração intracelular de ATP. Estes peptídeos apresentam atividade bacteriocinogênica muito baixa se forem empregados individualmente (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

- Classe II c: as bacteriocinas pertencentes a esta classe apresentam uma união covalente das terminações C e N, resultando em uma estrutura cíclica. São representantes desta classe: a enterocina AS-48, a circularina A e a reutericina 6 (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008).

c) Classe III: esta classe é composta por grandes proteínas (> 30 kDa) que são sensíveis ao tratamento térmico (60-100°C por 15 minutos) e complexas quanto à atividade e à estrutura proteica. O mecanismo de ação destas bacteriocinas se diferencia das demais classes por promover a lise celular através da lise da parede celular do micro-organismo alvo (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

A nisina, bacteriocina produzida por certas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* foi descoberta em 1933 e comercializada na forma purificada em 1953 na Inglaterra. Em 1983 a nisina foi adicionada a lista de aditivos alimentares na Europa e em 1988 seu uso foi aprovado em queijos processados nos Estados Unidos (COTTER; HILL; ROSS, 2005). No Brasil, o uso da nisina foi regulamentado em 1996, permitindo-se o emprego de até 12,5 mg.kg⁻¹ em queijos (BRASIL, 1996). Seu uso como aditivo alimentar está regulamentado em mais de 48 países e sua principal aplicação é em queijos processados, produtos lácteos e alimentos enlatados (O'SULLIVAN; ROSS; HILL, 2002). O uso da nisina também é indicado para preservar o aroma dos alimentos e prevenir a fermentação malolática precoce em vinhos quando a fermentação alcoólica ainda não está encerrada, prevenindo o crescimento de bactérias lácticas contaminantes que interferem no equilíbrio de sabor, aroma e características estéticas do vinho (MACEDO, 2005).

As bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos por, pelo menos, três diferentes maneiras: pela ação direta de bacteriocinas purificadas, como a nisina; em alimentos fermentados podem ser produzidas *in situ* pela adição de bactérias lácticas bacteriocinogênicas no lugar das tradicionais culturas iniciadoras; ou pela adição destas culturas como adjuntas (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008).

Existe um grande número de bacteriocinas identificadas, produzidas por várias espécies de bactérias lácticas, como *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. curvatus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*. Porém, somente as bacteriocinas nisina e pediocina PA1/AcH encontram-se disponíveis comercialmente para aplicação em alimentos (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

Dessa forma, a utilização de bactérias lácticas bacteriocinogênicas como culturas *starter* em produtos fermentados, como embutidos cárneos, apresenta-se como uma alternativa para garantir a inocuidade destes produtos. A utilização de culturas protetoras pode contribuir na redução da ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos fermentados. Em salames elaborados com culturas *starter* comercial foi verificada a ausência de *Listeria* no final do processo de maturação. Entretanto, nos salames elaborados com culturas protetoras (*Lactobacillus rhamnosus* LC-705, *L. rhamnosus* E-97800 e *L. plantarum*) foi observado uma ação adicional contra a *Listeria*, sendo que a ausência de *Listeria* foi verificada já no início do processo de maturação (TYÖPPÖNEN *et al.*, 2003).

As bacteriocinas tradicionalmente utilizadas possuem três limitações que reduzem sua efetividade como biopreservador de alimentos. Primeiramente, são ineficazes contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes Gram-negativos, leveduras e fungos. Em segundo lugar, sua ação é limitada a algumas cepas ou espécies de bactérias Gram-positivas e finalmente, o surgimento de variantes insensíveis às bacteriocinas dentro deste grupo de bactérias (HELANDER; WRIGHT; MATTILA-SANDHOLM, 1997).

Estudos demonstram que a eficiência da atividade das bacteriocinas é menor na matriz do alimento quando comparada *in vitro*. A produção de bacteriocinas pelas bactérias lácticas pode ser afetada por fatores intrínsecos dos alimentos como pH e composição dos nutrientes, a cultura pode perder espontaneamente a capacidade bacteriocinogênica e micro-organismos presentes no alimento podem exercer atividade antagonista. Quando presente no alimento, a atividade das bacteriocinas pode ser reduzida devido à ligação das bacteriocinas aos componentes do alimento, como proteína e gordura, a ação do pH, atividade das proteases ou outras enzimas, desuniformidade na distribuição da bacteriocina no alimento e baixa solubilidade (SCHILLINGER; GEISEN; HOLZAPFEL, 1996).

2.4 CULTURAS STARTER

Os cultivos iniciadores são culturas puras de micro-organismos ativos ou latentes que são intencionalmente adicionadas aos produtos cárneos, pois seu metabolismo provoca alterações desejáveis na matéria-prima produzindo alimentos com características peculiares e bastante aceitáveis (HAMMES; HERTEL, 1998).

As culturas *starter* são adicionadas aos produtos cárneos com o objetivo de reduzir o tempo de fermentação, assegurar a inocuidade do produto e para se obter um produto final de qualidade, com aroma, textura e sabor constantes (LUCKE, 2000).

As culturas *starter* comerciais são geralmente compostas de mais de um micro-organismo, visando somar suas ações, para se obter o efeito desejado no produto final (CAMPAGNOL, 2007). A aplicação de culturas *starter* em embutidos fermentados faz parte da produção industrial de embutidos. Os micro-organismos usados como cultura são divididos em dois grupos: bactérias ácido lácticas e os micro-organismos flavorizantes, frequentemente capazes de reduzir o nitrato. O primeiro grupo é composto principalmente por *Lactobacillus* e *Pediococcus* e o segundo pelos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* e leveduras e mofos (TERRA;FRIES;TERRA, 2004), conforme pode ser observado no Quadro 1.

continua			
Grupos	Gênero/Espécie	Atividade Metabólica	Benefícios
Bactérias lácticas	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. sake</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. pentosus</i> <i>Pediococcus cereviase</i> <i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i>	- Formação de ácido láctico	- Inibição de bactérias patogênicas e deteriorantes - Aceleração da formação da cor e secagem
Cocos catalase positiva	<i>Micrococcus varians</i> <i>M. lutens</i> <i>M. roseus</i> <i>Staphylococcus carnonus</i> <i>S. xylosus</i>	- Redução do nitrato e consumo de oxigênio - Destruição de peróxidos - Lipólise	- Formação e estabilização da cor - Retardamento da oxidação - Desenvolvimento do aroma

QUADRO 1 – PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS COMO CULTURAS STARTER EM EMBUTIDOS CÂRNEOS

		conclusão	
Leveduras	<i>Debaromyces hansenii</i> <i>Candida farmata</i>	- Consumo de oxigênio - Lipólise	- Retardamento da oxidação - Desenvolvimento do aroma
Bolores	<i>Penicilium nalgiovensis</i> <i>P. crysogenum</i>	- Consumo de oxigênio - Destruição de peróxidos - Oxidação de lactato - Proteólise - Lipólise	- Estabilidade da cor - Retardamento da oxidação - Desenvolvimento do aroma

QUADRO 1 – PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS COMO CULTURAS *STARTER* EM EMBUTIDOS CÂRNEOS

FONTE: LUCKE (1994) E TERRA (1998)

No uso das culturas *starter*, a quantidade a ser adicionada à massa cárnea é um fator muito importante, pois a quantidade de micro-organismos do *starter* deve superar em dois ciclos logarítmicos a de micro-organismos das carnes utilizadas como matéria-prima. Como o número máximo de micro-organismos aeróbios mesófilos aceitáveis na carne refrigerada é de $6 \log \text{UFC.g}^{-1}$, geralmente utiliza-se $8 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de micro-organismos de cultura *starter* (TERRA, 1998).

2.4.1 Critérios de seleção de bactérias lácticas para uso como *starter* em embutidos fermentados

Na seleção de culturas *starter* para aplicação em embutidos cárneos, várias características metabólicas apresentadas pelas bactérias lácticas (BAL) devem ser motivo de avaliação. A produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico, resultante da metabolização dos carboidratos, é uma das principais funções das BAL na produção de embutidos fermentados. A redução do pH ocasiona os seguintes efeitos nos salames: coagulação das proteínas que contribui com a formação da textura e da fatiabilidade; formação do gosto ácido característico; aumento da estabilidade dos salames e da segurança alimentar e desenvolvimento da cor vermelha característica dos produtos curados (HAMES; BANTLEON; MIN, 1990; BUCKENHÜSKES, 1993). A rápida formação de ácido láctico no início do processo de fermentação e a produção de quantidades que permitam o decréscimo do pH a

valores inferiores a 5,1, são requisitos importantes para seleção culturas *starter* de embutidos (AMMOR; MAYO, 2007).

Cepas heterofermentativas não são indicadas como *starter* em embutidos cárneos, pois alteram as características sensoriais pela produção de ácido acético, e o acúmulo de CO₂ pode levar à formação de orifícios no interior dos salames (BUCKENHÜSKES, 1993).

A grande maioria dos *Lactobacillus* é capaz de produzir peróxido de hidrogênio pela oxidação do lactato. Em certos alimentos isso é positivo, pois resulta na inibição de microrganismos indesejáveis. Entretanto, em produtos cárneos, os peróxidos levam a descoloração visto que essas substâncias atacam os hemepigmentos. Em salames produzidos por fermentação espontânea tem sido verificada a predominância de *L. sakei* e *L. curvatus*, sendo que várias cepas produzem rapidamente H₂O₂. Bactérias lácticas selecionadas para serem utilizadas como culturas *starter* para elaboração de embutidos devem apresentar pouca ou nenhuma capacidade de formação de peróxido de hidrogênio (BUCKENHÜSKES, 1993; HUGAS, MONFORT, 1997).

A capacidade da cultura *starter* em competir com a microbiota natural da carne e desempenhar as atividades metabólicas desejadas é dependente da sua taxa de multiplicação e sobrevivência nas condições empregadas na produção de embutidos fermentados. A capacidade de multiplicação em baixas temperaturas e valores de pH e a diferentes concentrações de NaCl e nitrito, são características fisiológicas importantes que as culturas *starter* devem apresentar, para que seu desempenho não seja limitado pelas condições do processamento (AMMOR; MAYO, 2007).

A seleção de culturas produtoras de dextrana deve ser evitada, pois atuam de forma negativa no processamento, principalmente no fatiamento (BUCKENHÜSKES, 1993).

2.5 LISTERIA MONOCYTOGENES

Listeria monocytogenes é um micro-organismo Gram-positivo, não formador de esporos e amplamente distribuído no ambiente podendo ser encontrado no solo,

vegetação em decomposição, águas residuais, rios, silagem e fezes de animais e humanos (SCHUCHAT; SWAMINATHAN; BROOME; 1991; FARBER; PETERKIN, 1991).

Por apresentar esta característica ubiqüitária, o micro-organismo pode facilmente entrar na cadeia alimentar humana (NORTEMANS *et al.*, 1998). Vegetais podem contaminar-se pelo solo ou adubos usados como fertilizantes. Animais podem carrear a bactéria sem apresentar doença, e contaminar os alimentos de origem animal como carne, leite e derivados. *L. monocytogenes* tem sido isolada numa grande variedade de produtos crus, como carnes cruas e vegetais, assim como alimentos que se contaminam após o processamento, principalmente os alimentos prontos para consumo (CDC, 2008).

Esse micro-organismo gera grande preocupação para a indústria de alimentos devido à sua habilidade de sobreviver e multiplicar-se em temperatura de refrigeração, fator que constitui em obstáculo para maioria dos patógenos de origem alimentar. Dessa forma, os alimentos refrigerados prontos para o consumo caso sejam insuficientemente processados e/ou contaminados após o processamento podem ser veículo de *L. monocytogenes* (MCCARTHY, 1997). BERSOT *et al.* (2008) avaliaram a capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* em mortadelas fatiadas embaladas a vácuo e estocadas a 5°C por 40 dias. Observou-se aumento da população de *L. monocytogenes* de 1,8 ciclo log durante a estocagem. Dessa forma, o controle do patógeno em alimentos prontos para o consumo deve estar aliado a programas de Boas Práticas de Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle.

Outro fator de grande importância para a indústria de alimentos é a capacidade desse micro-organismo formar biofilmes. Os biofilmes são agregados de células aderidos a uma superfície por uma matriz polissacarídica, podendo-se localizar em diferentes locais dentro da indústria de alimentos, tais como superfícies de manipulação de alimentos, áreas de estocagem e em superfícies de processamento como aço inoxidável. As bactérias aderidas à superfície podem ser transferidas ao alimento durante o processamento. A eliminação dos biofilmes é um grande desafio para a indústria, uma vez que são mais resistentes à detergentes e sanitizantes, quando comparadas à células em suspensão (ELORTONDO *et al.*, 1999; GANDHI;CHIKINDAS, 2007).

L. monocytogenes tem sido isolada em vários pontos nas unidades processadoras de suínos. A incidência do micro-organismo aumenta durante as etapas do processamento do abate para a desossa (THÉVENOT *et al.*, 2005). A contaminação por *L. monocytogenes* em embutidos fermentados pode ocorrer em várias etapas do processamento: as matérias-primas utilizadas podem estar contaminadas com o patógeno e as etapas de fermentação e maturação serem ineficientes no controle do micro-organismo ou por contaminação cruzada (THÉVENOT; DERNBURG,VERNOZY-ROZAND, 2006).

A contaminação por *L. monocytogenes* em 13 unidades produtoras de embutidos fermentados na França foi avaliada por THÉVENOT *et al.* (2005). Foram coletadas amostras de matérias-primas, do produto pronto para comercialização e *swabs* de superfícies e equipamentos totalizando 1029 amostras. 15,1% do maquinário após passar por processo de higienização encontrava-se contaminado e 50,9% dos mesmos equipamentos estavam contaminados durante a produção. Das matérias-primas utilizadas, 33,9% apresentavam o patógeno e após as etapas de moagem e embutimento a contaminação atingiu valores de 71,6%. Após as etapas de fermentação e secagem, 10% dos embutidos prontos para o consumo encontravam-se contaminados por *L. monocytogenes* ($< 3 \text{ UFC.g}^{-1}$).

Durante a fermentação e o processo de secagem de salames, a população de *L. monocytogenes* tende a diminuir substancialmente devido ao conjunto de obstáculos: diminuição do pH e da atividade de água e elevada concentração NaCl (THÉVENOT *et al.*, 2005). No entanto, os obstáculos presentes nos produtos cárneos fermentados não são suficientes para prevenir a sobrevivência de *L. monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 (JOHNSON *et al.*, 1988; TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ; MATTILA-SANDHOLM, 2003).

2.6 INOCUIDADE DA LINGUIÇA COLONIAL

Denomina-se linguiça colonial o produto cárneo industrializado, obtido exclusivamente de carnes suínas, adicionado de toucinho, ingredientes, moído em granulometria variável, embutido em envoltório natural, curado, que sofre um processo rápido de fermentação, defumado e dessecado (BRASIL, 2000).

As linguiças coloniais são produtos de grande aceitação da região Sul do Brasil, especialmente pela influência das culturas alemã e italiana e também pela cultura na produção de suínos em pequenas propriedades, para o consumo domiciliar ou para a comercialização. Tradicionalmente, a linguiça colonial é produzida de maneira artesanal, no próprio domicílio ou pequenas indústrias, sendo comercializada em feiras, supermercados e bancas de produtos coloniais localizadas ao longo de rodovias (RITTER *et al.*, 2003; MAGRO; KLEIN, 2006).

Os embutidos cárneos são produtos fabricados com carnes cruas que não passam por cocção ao longo do processamento e nem previamente ao consumo. Dessa forma, a segurança microbiológica desses produtos é resultado da associação de obstáculos, como a baixa atividade de água, presença de nitrito e cloreto de sódio, baixo pH e presença de substâncias antimicrobianas formadas durante o processamento (OLIVEIRA; MENDONÇA, 2004).

A Instrução Normativa nº 22 de 31 de julho de 2000 estabelece no anexo XIV o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça Colonial (BRASIL, 2000). Diferentemente dos demais anexos que compõem a IN 22, o anexo XIV não estabelece valores máximos de umidade e atividade de água para linguiças coloniais. Além disso, o parâmetro de pH não está estabelecido para nenhum tipo de embutido fermentado.

Acontece, porém, que a inexistência de valores mínimos de pH e máximo de atividade de água pode favorecer que patógenos se desenvolvam tornando duvidosa a inocuidade deste produto.

A presença de *L. monocytogenes* em salames artesanais produzidos por pequenas indústrias da região Sul do Brasil foi verificada por DALLA SANTA (2008). Das cinquenta amostras avaliadas, 8% foram positivas para o patógeno.

Em trabalho realizado por DEGENHARDT e SANT'ANNA (2007) foram avaliadas 31 amostras de embutidos coloniais produzidos na região Meio-Oeste de Santa Catarina. Das vinte amostras rotuladas como salame colonial, 90% foram positivas para o gênero *Listeria*, sendo que 75% apresentaram *L. innocua*, 10% *L. gray* e 5% *L. monocytogenes*. Com relação às onze amostras rotuladas como linguiça colonial, cinco foram positivas para *L. innocua* não sendo observada a presença de *L. monocytogenes*. Apenas duas amostras de linguiça colonial (18,2%) apresentaram atividade de água inferior a 0,92. Verificou-se também que boa parte

dos embutidos é disponibilizada para consumo antes de atingirem o nível de maturação adequado.

Valores superiores da presença do gênero *Listeria* em embutidos cárneos artesanais foram encontrados por GOTTARDO *et al.* (2009). Foram avaliadas 60 amostras obtidas na região Oeste do estado do Paraná e 78,3% apresentaram-se contaminadas por *Listeria* sp, sendo que destas 55% apresentaram teste bioquímico compatível com *L. monocytogenes*.

Dessa forma, a busca de novos obstáculos ao desenvolvimento de *L. monocytogenes* em produtos cárneos fermentados é necessária, visto que o micro-organismo tem habilidade de sobreviver em condições adversas e apresenta um risco potencial à saúde do consumidor.

As bactérias lácticas possuem um efeito antagonista frente à micro-organismos indesejáveis, pela competição por nutrientes e produção de metabólitos antimicrobianos (HOLZAPFEL; GEISEN; SCHILLINGER, 1995). A utilização de culturas bioprotetoras pode contribuir na redução da ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos fermentados pela produção de bacteriocinas (HUGAS *et al.*, 1995). Culturas de bactérias lácticas bacteriocinogênicas podem ser utilizadas como *starter* para controlar patógenos em carnes e produtos cárneos (CARVALHO *et al.*, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE BACTERIOCINOGÊNICA

3.1.1 Micro-organismos

Para a verificação da capacidade produtora de bacteriocinas foram avaliados 279 isolados de bactérias lácticas (BAL) obtidos de salames coloniais produzidos por fermentação espontânea. Desse total, 175 BAL foram isoladas por DALLA SANTA (2008) durante execução da tese de doutorado e gentilmente fornecidas para este projeto. As 104 BAL restantes foram isoladas no Laboratório de Controle Microbiológico de Água e Alimentos – UFPR, *Campus* Palotina a partir de amostras de salames obtidos na região Oeste do Paraná. Os isolados foram purificados em Ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (DIFCO, Código 288210) e mantidos em caldo MRS (DIFCO, 288130) adicionado de 20% (v/v) de glicerol estéril e armazenados a -18°C em tubos eppendorf™ (SAMELIS; MAUROGENAKIS; METAXOPOULOS, 1994).

Quatro diferentes isolados de *L. monocytogenes* foram utilizados para verificar o efeito inibitório das BAL, dos quais, três isolados foram obtidos de salames coloniais no Laboratório de Controle Microbiológico de Água e Alimentos da Universidade Federal do Paraná – *Campus* Palotina e uma cepa de referência (ATCC 7644).

3.1.2 Detecção da atividade antimicrobiana (*Spot- on- lawn*)

Placas contendo Ágar Soja Triptona (OXOID; CM 0131) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (DIFCO, 212750) (TSA-YE) foram semeadas superficialmente com 2 µl de cada isolado de BAL e incubadas em anaerobiose (OXOID; AnaeroGen 2,5 L) a 30°C/24h. Nesta etapa optou-se pela utilização de placas de TSA-YE uma vez que a glicose proveniente do ágar MRS poderia inibir o desenvolvimento da cultura de *L. monocytogenes* pela possível produção de ácido láctico.

Cada isolado de *L. monocytogenes* foi cultivado separadamente em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) (OXOID; CM 1032) a 37°C/18 h e 100 µl foram adicionados a um erlenmeyer contendo 50 ml ágar BHI semi-sólido (adicionado de 0,8% de ágar bacteriológico) a fim de obter uma concentração de 5 a 6 log UFC.mL⁻¹ de *L. monocytogenes*.

Em seguida, as placas de TSA-YE com os cultivos de BAL receberam sobrecamada de 8 ml do ágar BHI semi-sólido contendo *L. monocytogenes*. As placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C/24h e a inibição foi verificada pela presença de halo translúcido ao redor da colônia (LEWUS; KAISER; MONTVILLE, 1991), conforme mostrado na Figura 4. Cada isolado de BAL foi testado separadamente frente às quatro culturas de *L. monocytogenes*.

A inibição foi considerada positiva quando a largura medida da borda da colônia à borda do halo de inibição foi superior a 0,5 mm (SCHILLINGER; LÜCKE, 1989).

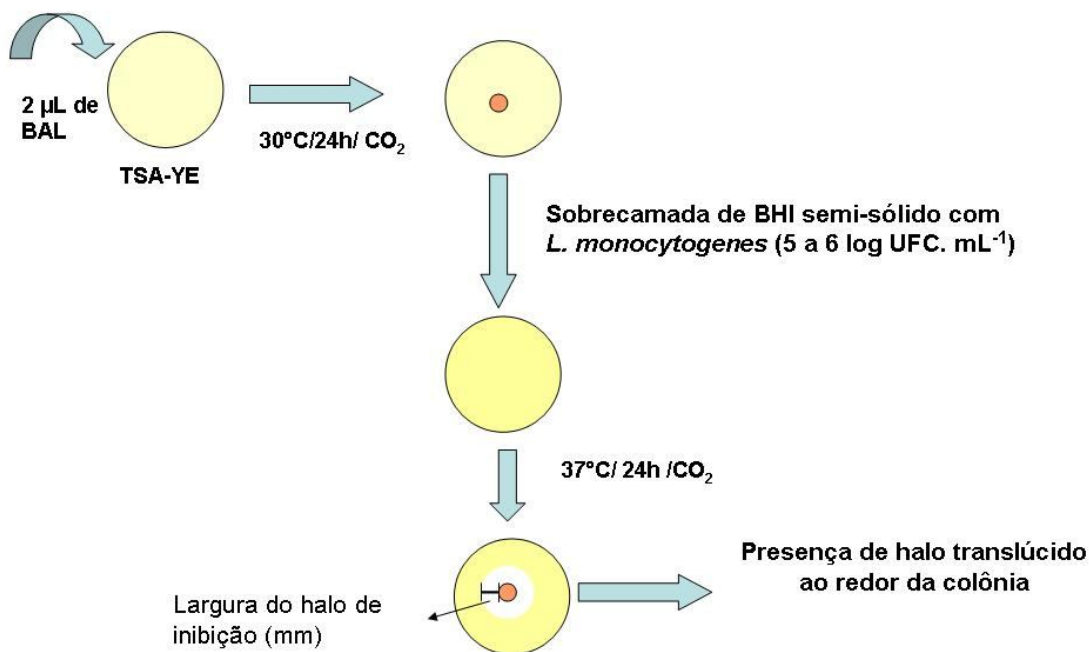


FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS

FONTE: A autora (2009)

3.1.3 Detecção de bacteriófagos

A possível inibição causada por bacteriófagos foi avaliada conforme metodologia proposta por LEWUS; KAISER; MONTVILLE (1991). Uma porção da zona de inibição (item 3.1.2) foi retirada, com auxílio de uma ponteira cortada esterilizada, e adicionada a 3 ml de caldo BHI e triturada com o auxílio de um bastão de vidro esterilizado. Após uma hora em repouso em temperatura ambiente, 100 µl do material em suspensão e 100 µl de um isolado de *L. monocytogenes* cultivado a 37°C/18-24 h em caldo BHI foram suspensos em 4 ml de BHI semi-sólido (contendo 0,8% de ágar). Esta suspensão foi semeada em placa de ágar BHI e incubada a 30°C/18-24 h. A formação de zonas de lise foi considerada indicativa de atividade fágica.

3.1.4 Caracterização do composto antimicrobiano

Os isolados de BAL que apresentaram halo de inibição frente aos quatro isolados de *L. monocytogenes* e atividade fágica negativa foram submetidos ao ensaio de difusão em poços. Os isolados de BAL mantidas em caldo MRS adicionado de 20% de glicerol estéril e armazenadas -18°C em tubos eppendorf foram cultivadas em 100 ml de caldo MRS a 30°C/24 h. O caldo foi centrifugado a 10.844 x g por 15 minutos (SIGMA 6-15) e o sobrenadante foi esterilizado por filtração em membrana com poros de 0,22 µm com baixa capacidade de ligação de proteínas (GVWP Durapore, Millipore). O pH do sobrenadante foi ajustado em 6,5 utilizando solução de NaOH 1N para eliminar a inibição causada pela presença de ácido láctico. 40 µl do sobrenadante foram tratados com catalase (300 U.ml⁻¹) (C3515, Sigma-Aldrich) com objetivo de descartar a inibição pela presença de peróxido de hidrogênio (AMMOR *et al.*, 2006).

Cada isolado de *L. monocytogenes* foi cultivado separadamente em caldo BHI a 37°C/18 h e 100 µl foram adicionados a um erlenmeyer contendo BHI semi-sólido (adicionado de 0,8% de ágar bacteriológico) a fim de obter uma concentração de 5 a 6 log UFC.ml⁻¹ de *L. monocytogenes*. O ágar semi-sólido (20 ml) foi

transferido para uma placa de Petri e após a solidificação foram feitos dois poços de 5 mm de diâmetro. Foram adicionados 40 µl do sobrenadante neutralizado no primeiro poço, e no segundo 40 µl do sobrenadante neutralizado adicionado de catalase. As placas foram mantidas a 20°C por 4 horas, para permitir a difusão do sobrenadante no ágar e posteriormente foram incubadas a 37°C/24 h (HARRIS *et al.*, 1989). Os halos de inibição foram medidos em milímetros.

3.1.5 Sensibilidade a enzimas proteolíticas e ao tratamento térmico

Para avaliar a sensibilidade do composto antimicrobiano frente a enzimas proteolíticas, os sobrenadantes obtidos conforme item 3.1.4 foram tratados com as enzimas α -quimiotripsina C-4129, protease P-5147, tripsina T-4799 e proteinase-K P-6556 (Sigma-Aldrich Chemie) em concentração final de 1 mg.ml⁻¹. As amostras foram incubadas a 37°C/1 h e a atividade residual foi determinada pelo ensaio de difusão em poços conforme item 3.1.4 (GARRIGA *et al.*, 1993).

A termosensibilidade do composto antimicrobiano foi avaliada tratando-se os sobrenadantes obtidos conforme item 3.1.4 a 80°C por 10 minutos e a 100°C por 20 min (HUGAS *et al.*, 1995; AMMOR *et al.*, 2006). A atividade residual foi avaliada pelo ensaio de difusão em poços, descrito no item 3.1.4

3.1.6 Quantificação da atividade bacteriocinogênica

A quantificação da atividade bacteriocinogênica foi realizada pelo ensaio de diluição crítica, conforme preconizado por MAYR-HARTING; HEDGES; BERKLEY (1972). O sobrenadante foi diluído sucessivamente na razão de 1:2 (v/v) em placas de microtitulação, utilizando-se solução-tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7. Em seguida, alíquotas de 10 µl de cada diluição foram depositadas em placas de Petri contendo BHI semi-sólido, previamente inoculado com as culturas de *L. monocytogenes* na concentração de 7 log UFC.ml⁻¹. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 1 hora e, em seguida, incubadas a 37°C/ 24 h. O título da

bacteriocina, expresso em unidade arbitrária de bacteriocina por mililitro (UA.ml⁻¹), foi definido como sendo a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição, multiplicada por 100 (BROMBERG *et al.*, 2006).

3.2 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS PRODUTORAS DE BACTERIOCINA

Os isolados de BAL que apresentaram atividade bacteriocinogênica foram submetidos a testes de identificação e caracterização, objetivando selecionar aquelas que apresentassem características tecnológicas favoráveis para utilização como *starter* na produção de embutidos cárneos fermentados. Inicialmente, os isolados foram propagados duas vezes em caldo MRS, incubadas a 30°C/18 h e utilizadas de inóculo para os testes de caracterização e identificação (SAMELIS; MAUROGENAKIS; METAXOPOULOS, 1994).

3.2.1 Determinação da morfologia celular e coloração de Gram

A morfologia das células e a reação de Gram foi verificada pela visualização em microscópio pelo método tradicional de coloração de Gram (PELCZAR Jr.; CHAN; KRIEG, 1996).

3.2.2 Produção de catalase

A produção da enzima catalase pelas BAL foi realizada adicionando-se gotas de solução de peróxido de hidrogênio a 3% diretamente sobre as colônias (DROSINOS *et al.*, 2005). A produção de bolhas de gás representou resultado positivo.

3.2.3 Produção de gás carbônico (CO₂)

A produção de gás a partir da glicose foi verificada em tubos contendo caldo MRS, sendo o citrato de amônia substituído por sulfato de amônia, com tubos de Durham invertidos após incubação a 30°C por 5 dias (DROSINOS *et al.*, 2005).

3.2.4 Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A produção de H₂O₂ foi avaliada em ágar MRS suplementado com 0,75% de dióxido de manganês e 0,5% de goma xantana. As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias e foi observada diariamente a formação de zonas claras ao redor da estria devido à produção de H₂O₂ pela isolado (SAMELIS; MAUROGENAKIS; METAXOPOULOS, 1994).

3.2.5 Capacidade de acidificação

A capacidade de acidificação dos isolados foi determinada em caldo MRS (pH 6,8), sem fosfato dipotássico e o citrato de amônia substituído por 0,3% de citrato de sódio. O pH foi medido em potenciômetro digital (Marte MB-10) após incubação das culturas por 7 dias a 30°C (SHAW; HARDING, 1984).

3.2.6 Capacidade de multiplicação em diferentes temperaturas

A capacidade de multiplicação em diferentes temperaturas foi avaliada em caldo MRS após incubação por 7 dias a 8°C (HUGAS *et al.*, 1993) e 72 h a 15°C, 37°C e 45°C (DROSINOS *et al.*, 2005).

3.2.7 Capacidade de multiplicação em diferentes valores de pH

A capacidade de multiplicação dos isolados de bactérias lácticas isoladas foi verificada em caldo MRS, com pH ajustado a 3, 4 e 5 com ácido clorídrico ($\text{HCl } 10 \text{ mol.l}^{-1}$), após 48 h de incubação a 35°C (PAPAMANOLI *et al.*, 2003).

3.2.8 Tolerância ao cloreto de sódio (NaCl) e ao nitrito de sódio (NaNO_2)

A tolerância a 5%, 8% e 10% de NaCl e a 3% de NaCl associado a 150 ppm de nitrito foi avaliada em caldo MRS após incubação a 30°C por 72 horas (HUGAS *et al.*, 1993; DROSINOS *et al.*, 2005).

3.2.9 Produção de dextrana

A capacidade de produção de dextrana foi realizada em ágar MRS, sendo que a glicose do meio foi substituída por 5% de sacarose (SAMELIS *et al.*, 1994). As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias e as células observadas em microscópio ótico para verificar a presença de material capsular (HITCHENER *et al.*, 1982).

3.2.10 Identificação bioquímica

Os isolados de BAL produtores de bacteriocina e que apresentaram características metabólicas adequadas para utilização como *starter* na produção de embutidos cárneos foram identificadas pelo sistema API 50 CHL (BioMerieux, Marcy L'Etoile, France).

Os dados obtidos na fermentação das diferentes fontes de carbono foram analisados pelo programa APILAB PLUS (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) (DROSINOS *et al.*, 2005).

3.3 PROCESSAMENTO DA LINGUIÇA COLONIAL

3.3.1 Matérias-primas e ingredientes

A carne suína magra (pernil e paleta) e o toucinho congelado foram obtidos junto a uma unidade de abate e industrialização de suínos próximo ao local de execução do experimento. Os ingredientes sal comum, sal de cura, glicose, sacarose, acelerador de cura, pimenta, alho, noz-moscada foram adquiridos no comércio local.

3.3.2 Preparação do inóculo das culturas de bactérias lácticas

Foram selecionadas duas culturas de *Lactobacillus plantarum* que apresentaram características tecnológicas favoráveis para utilização como *starter* na produção da linguiça colonial. A cultura de *L. plantarum* não produtora de bacteriocina (Bac⁻), utilizada como controle negativo, foi isolada de salames artesanais por DALLA SANTA (2008).

As culturas das bactérias lácticas (mantidas sob refrigeração em ágar) foram cultivadas em caldo MRS a 30°C/24h. A seguir, o caldo foi semeado por esgotamento em placa contendo ágar MRS e incubada a 30°C/24 h.

Uma colônia isolada foi transferida para um erlenmeyer contendo 100 ml de caldo MRS e incubado a 30°C/18h. O caldo fermentado foi centrifugado a 10.844 x g por 10 min (SIGMA 6-15) e o sobrenadante desprezado. A biomassa foi lavada e ressuspensa em solução salina a 0,85% e foram preparadas soluções decimais de modo a obter o inóculo de 6 log UFC.g⁻¹ na massa do embutido (TYÖPPÖNEN *et al.*,

2003). Paralelamente, estas diluições foram semeadas em ágar MRS para confirmação da população de bactéria láctica no inóculo.

3.3.3 Preparação do inóculo de *L. monocytogenes*

Foram utilizados três isolados de *L. monocytogenes* previamente isoladas de salames coloniais no Laboratório de Controle Microbiológico de Água e Alimentos da Universidade Federal do Paraná – *Campus* Palotina e 1 cepa de referência (ATCC 7644).

Cada isolado mantido em ágar TSA-YE e estocado em geladeira foi resuspensa separadamente em tubos contendo caldo BHI e incubados a 37°C/24 h. A seguir, cada caldo foi semeado separadamente em placas de petri contendo ágar TSA-YE. As placas foram incubadas a 37°C/24 h.

Após o período de incubação foi transferida uma colônia de cada isolado, separadamente, para um erlenmeyer contendo 100 ml de caldo BHI. O caldo foi incubado a 37°C/18 h.

O caldo foi centrifugado a 5.000 x g por 10 min (SIGMA 6-15) e o sobrenadante desprezado. A biomassa foi lavada e ressuspensa em solução salina 0,85% e foram preparadas soluções decimais de modo a obter o inóculo de 4 log UFC.g⁻¹ na massa do embutido (HUGAS *et al.*, 1995). Paralelamente, estas diluições foram semeadas em ágar TSA-YE para confirmação da população de *L. monocytogenes*.

Imediatamente antes da inoculação na massa, cada um dos quatro inóculos suspensos em 10 ml de solução salina 0,85%, foram misturados num único frasco estéril, para que os quatro isolados fossem adicionados à massa cárnea, num procedimento único.

3.3.4 Delineamento experimental

Para avaliar o efeito da inoculação de *L. plantarum* produtor de bacteriocina frente *L. monocytogenes* durante a maturação de linguiças coloniais, foram realizados seis tratamentos, conforme Tabela 1.

Um tratamento controle, sem adição de inibidores, um tratamento com adição de *L. plantarum* não produtor de bacteriocina (Bac^-) e um tratamento com adição de *L. plantarum* produtor de bacteriocina (Bac^+). Cada tratamento teve uma batelada contaminada artificialmente com *pool* de *L. monocytogenes*, totalizando seis tratamentos. Foram realizadas três repetições de cada tratamento.

TABELA 1- TRATAMENTOS REALIZADOS NO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Tratamento	Descrição das formulações
A	Formulação Padrão
B	Formulação Padrão + <i>L. monocytogenes</i>
C	Formulação Padrão + <i>L. plantarum</i> (Bac^-)
D	Formulação Padrão + <i>L. plantarum</i> (Bac^-) + <i>L. monocytogenes</i>
E	Formulação Padrão + <i>L. plantarum</i> (Bac^+)
F	Formulação Padrão + <i>L. plantarum</i> (Bac^+) + <i>L. monocytogenes</i>

Os experimentos foram conduzidos na Planta Piloto de Carnes da Universidade Federal do Paraná - *Campus* Palotina.

3.3.5 Processamento dos embutidos fermentados

A formulação do embutido cárneo utilizada foi de linguiça tipo colonial descrita no Quadro 2. Para a elaboração da linguiça colonial foi utilizada carne suína resfriada (pernil e paleta) e toucinho congelado. O preparo da massa foi iniciado pela moagem da matéria-prima cárnea e do toucinho em disco de aço inox de 10 mm. A carne suína juntamente com parte do cloreto de sódio foram levados a misturadeira (BECCARO MB-25) para promover a extração das proteínas miofibrilares que respondem pela união dos fragmentos de carne na linguiça colonial. Posteriormente, foram adicionados à massa o toucinho, pimenta branca, alho, noz-moscada, glicose,

sacarose e o restante do cloreto de sódio. Os sais de cura e o fixador foram adicionados à massa previamente diluídos em água destilada para facilitar a mistura, sendo o fixador adicionado em seguida ao sal de cura.

Matéria-Prima	Quantidade (kg)
Carne Suína	80
Toucinho	20
Ingredientes	Quantidade (kg)
Sal	3
Glicose	0,5
Sacarose	0,5
Sal de cura	0,6
Pimenta	0,1
Alho	0,5
Noz moscada	0,02
Fixador A-80	0,25

QUADRO 2– FORMULAÇÃO PADRÃO DE LINGUIÇA COLONIAL

FONTE: Adaptado de TERRA (1998)

Depois de concluída a mistura, a massa cárnea foi dividida em seis porções e cada porção foi adicionada dos respectivos inóculos, conforme os tratamentos citados na Tabela 1.

A massa cárnea de cada tratamento foi embutida (JAMAR EJVI-15) manualmente em tripa natural suína com diâmetro entre 45 e 55 mm. As tripas foram previamente mergulhadas em solução de ácido láctico a 2% para assegurar sua qualidade microbiológica (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

Após o embutimento, os produtos foram identificados de acordo com o tratamento ao qual pertenciam e encaminhados à maturação em câmara climática com temperatura e umidade controlada (INSTALAFRIO) (Figura 5). As condições em que as linguiças coloniais foram submetidas na etapa de maturação seguem o esquema descrito no Quadro 3. O controle da temperatura e umidade relativa durante a maturação foi realizado pelo controlador SITRAD MT-530, com registros a cada 15 minutos, conforme figura apresentada no Anexo.



FIGURA 5 – LINGUIÇAS COLONIAIS ACONDICIONADAS NA CÂMARA DE MATURAÇÃO

FONTE: A autora (2010)

Tempo (dias)	Umidade Relativa (%)	Temperatura (°C)
1	95	25
2	93	24
3	90	23
4	85	22
5	80	21
6	75	20
7 - 28	75	18

QUADRO 3 - CONDIÇÕES UTILIZADAS NA CÂMARA CLIMATIZADA DURANTE FERMENTAÇÃO E SECAGEM DA LINGUIÇA COLONIAL

FONTE: TERRA (1998)

3.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas foram realizadas nos dias 0, 3, 5, 7, 13, 16 e 19 dias de processamento. Somente os tratamentos não inoculados com *L.*

monocytogenes, foram submetidos às análises físico-químicas para evitar a contaminação dos equipamentos. Foram utilizadas duas peças de linguiça colonial dos tratamentos para compor a unidade analítica. O envoltório das peças foi removido e retiradas assepticamente porções de 100 g de cada peça de linguiça colonial e trituradas em processador de alimentos. Todas as determinações foram realizadas em triplicata, sendo o resultado a média das repetições.

3.4.1 Determinação do pH

Os valores de pH das linguiças coloniais foram medidos em potenciômetro digital (Marte, MB-10). Cinquenta gramas da amostra foram homogeneizadas em 10 ml de água destilada por dois minutos e a leitura foi feita após cinco minutos de estabilização (BRASIL, 1981).

3.4.2 Determinação da atividade de água (a_w)

A atividade de água foi mensurada utilizando aparelho medidor de atividade de água (Aqualab Lite) por medida direta nas amostras previamente trituradas.

3.4.3 Determinação de umidade

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico com desidratação em estufa a 105°C até peso constante, conforme metodologia descrita pela AOAC (2000).

3.4.4 Determinação da perda de peso

A perda de peso durante a maturação e secagem foi determinada pelo método gravimétrico mediante a pesagem de duas peças de linguiça colonial de cada tratamento antes da maturação e após cada tempo de amostragem (MACEDO, 2005).

3.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas foram realizadas nos dias 0, 3, 5, 7, 10, 13, 16 e 19 de processamento. Para realização das análises, foram utilizadas duas peças de linguiça colonial de cada tratamento. O envoltório das peças foi removido e retiradas assepticamente porções de 100 g de cada peça do produto e trituradas, a partir do homogeneizado foi retirada a unidade analítica de 25 g.

3.5.1 Contagem de bactérias lácticas

A quantidade de bactérias lácticas foi determinada pela técnica de semeadura em profundidade em ágar de Man Rogosa e Sharpe (MRS) a 30°C por 72 h em atmosfera microaerófila, conforme metodologia descrita por SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA (2001).

3.5.2 Enumeração e detecção de *Listeria monocytogenes*

A enumeração e a detecção de *L. monocytogenes* foram realizadas conforme metodologia proposta pela ISO 11290-1 (1996) e ISO 11290-2 (1996). Nas amostras em que a contagem esperada de *L. monocytogenes* foi inferior a 10

UFC.g⁻¹, limite do método de enumeração, foi realizado o método de detecção simultaneamente ao método de enumeração.

Para enumeração de *L. monocytogenes* a unidade analítica de 25 g foi adicionada a 225 ml de caldo half fraser (M 890A, BIOSYSTEMS), sem a adição de suplementos. Após homogeneização em *stomacher* (IRT), o homogeneizado foi incubado a 20°C por 1 hora. A seguir foram realizadas as diluições decimais necessárias e 1ml de cada diluição foi semeada na superfície de placas de Ágar Listeria Ottavani e Agosti (ALOA), sendo distribuído o volume por três placas, duas com 300 µl e uma com 400 µl (AEB 150072, AES) e incubadas a 37°C por 24 a 48 h. Foram enumeradas as colônias azul-esverdeadas com presença de halo opaco ao redor da colônia, características de *L. monocytogenes*. em ágar ALOA.

De 3 a 5 colônias típicas foram purificadas em ágar TSA-YE para posterior confirmação bioquímica. As provas bioquímicas utilizadas foram: coloração de Gram, teste de catalase, motilidade, teste de hemólise, utilização de carboidratos (dextrose, xilose, ramnose e manitol).

Para a detecção de *L. monocytogenes* foi utilizado o caldo half fraser após incubação (proveniente da técnica de enumeração). Foram adicionados os suplementos seletivos e o caldo foi incubado a 30°C/ 24 h. A seguir, foi transferido a partir do caldo half-fraser uma alíquota de 100 µl para 10 ml de caldo Fraser (M1083, BIOSYSTEMS). O caldo foi incubado a 37°C/ 24 h. Após a incubação, uma alçada do caldo Fraser foi semeada em placas contendo ágar ALOA e ágar PALCAM (MERCK) e incubadas a 37°C por 48 h. As colônias azul-esverdeadas com presença de halo opaco ao redor da colônia, características de *L. monocytogenes* em ágar ALOA e colônias de coloração verde escuro ou oliva com 1,5 a 2 mm de diâmetro, com centro escuro e halo negro, características de *Listeria* sp. em ágar PALCAM, foram purificadas em ágar TSA-YE e submetidas às provas bioquímicas.

3.5.3 Detecção da atividade bacteriocinogênica de *L. plantarum* durante maturação das linguças coloniais

Para confirmar a produção da bacteriocina durante a fermentação e secagem da linguça colonial, foram analisadas as amostras dos tratamentos

inoculados com *pool* de *L. monocytogenes* e do isolado de *L. plantarum*, produtor de bacteriocina (Bac⁺), no terceiro e sétimo dia de processamento.

A extração da bacteriocina do produto cárneo foi realizada adicionando 10 ml de uma solução a 5 % de Tween 80 em 0,01N de KH₂PO₄ em 30 g do embutido. Depois de 30 minutos em temperatura ambiente, o pH da solução foi ajustado para 6, centrifugado 10.844 x g por 15 minutos (SIGMA 6-15) e o sobrenadante foi esterilizado por filtração em membrana com poros de 0,22 µm com baixa capacidade de ligação de proteínas (GVWP Durapore, Millipore). Uma cultura de *L. monocytogenes* foi cultivada em caldo BHI a 37°C/18h e 100 µl foi adicionado a 50 ml de BHI semi-sólido suplementado com 0,1% de Tween 80. O ágar foi vertido em placas e foram feitos poços de 6 mm e 2 mm de diâmetro. Aos poços de 6 mm, foram adicionados 50 µl do sobrenadante filtrado e aos poços de 2 mm foram adicionadas 5 µL das enzimas protease e α-quimiotripsina (20 mg.ml⁻¹) para verificar a natureza proteica do inibidor. As placas foram mantidas a 7°C/2 h e, em seguida, incubadas a 25°C/ 24 h (ALVES *et al.*, 2006).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias, utilizando nível de significância de 1%. As análises foram realizadas utilizando o programa SigmaStat for Windows® Version 3.0.1, SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE BACTERIOCINOGENICA

Os resultados da capacidade bacteriocinogênica das BAL isoladas de embutidos cárneos estão apresentados na Tabela 2. Dos 279 isolados de BAL avaliados pelo teste de inibição direta (*Spot-on-lawn*), 30 (10,75%) apresentaram halos de inibição frente aos quatro isolados de *L. monocytogenes*. Pela Figura 6 observam-se, como exemplo, os halos de inibição frente à *L. monocytogenes* (ATCC 7644) produzidos por quatro isolados de BAL.

TABELA 2 – LARGURA DO HALO DE INIBIÇÃO^a (mm) PRODUZIDO PELOS 30 CULTIVOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE EMBUTIDOS CÁRNEOS FRENTE AOS ISOLADOS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Isolados de BAL ^b	Isolados de <i>L. monocytogenes</i>			
	ATCC 7644	01	02	03
021	6	4	4	4
023	5	4	3	4
024	6	6	6	6
032	8	7	7	6
033	6	6	6	6
034	7	7	6	6
035	6	7	7	7
036	7	6	7	7
037	6	5	4	4
041	7	7	6	6
081	4	2	2	2
082	4	2	2	2
083	3	2	3	2
091	3	2	2	2
135	7	8	8	8
136	8	8	7	7
301	6	6	6	7
304	4	5	5	5
322	6	3	3	3
323	9	9	9	9
324	3	2	3	2
401	7	7	7	7
482	9	9	9	9
484	9	9	8	8
485	10	10	9	9
505	9	9	9	9
602	5	5	6	5
633	3	3	3	3
634	3	3	3	3
636	4	3	4	4

^a Largura do halo de inibição medido da borda da colônia à borda do halo de inibição (mm).

^b O primeiro e segundo algarismos correspondem ao número da amostra de embutido cárneo que a BAL foi isolada e o terceiro refere-se à ordem do isolamento

Vários estudos têm demonstrado a atividade antimicrobiana direta de bactérias lácticas frente a *L. monocytogenes*, no entanto a porcentagem de BAL positivas para o teste é bastante variável. A atividade antimicrobiana direta de 221 culturas de *Lactobacillus* isoladas de carne e produtos cárneos, frente à *L. monocytogenes* foi verificada por SCHILLINGER E LUCKE (1989). Do total das culturas avaliadas, 4,97% apresentaram atividade inibitória frente ao patógeno estudado. ALBANO *et al.* (2006) avaliaram 206 culturas de BAL isoladas de salames obtidos por fermentação espontânea da região Norte de Portugal, e 6,79% das culturas exibiram atividade inibitória frente à *L. monocytogenes* e *L. innocua*. Resultados superiores foram obtidos por PRADO *et al.* (2006), quando foram avaliadas 336 culturas de BAL isoladas de linguiças provenientes da cidade de Santa Luzia-MG. 32% das culturas de BAL apresentaram atividade antimicrobiana direta frente à *L. monocytogenes* Scott A e ATCC 7644.

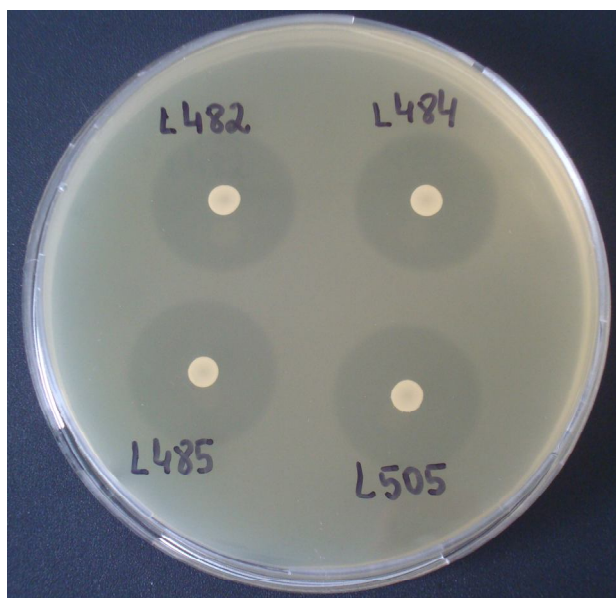


FIGURA 6 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DIRETA DE QUATRO ISOLADOS DE BAL FRENTE À *L. MONOCYTOGENES* ATCC 7644
FONTE: A autora (2009)

A presença de isolados lisogênicos, isto é, que apresentam um bacteriófago integrado ao seu DNA, promovem fenômenos bastante semelhantes às BAL produtoras de bacteriocina, dificultando a diferenciação e interferindo nos resultados (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976). Não foi detectada a presença de

bacteriófagos líticos nos 30 isolados de BAL testados. A diferença entre as BAL produtoras de bacteriocina e as lisogênicas reside no fato de que a bacteriocina não possui os determinantes genéticos necessários para auto-replicação no micro-organismo susceptível (MAYR-HARTING; HEDGES; BERKLEY, 1972).

Os sobrenadantes dos 30 isolados de BAL que apresentaram inibição pelo teste *spot-on-lawn* e atividade fágica negativa foram submetidos ao ensaio de difusão em poços. Quando o pH dos sobrenadantes foi neutralizado e adicionado de catalase, apenas 4 isolados (323, 484, 485 e 505) apresentaram atividade inibitória frente aos isolados de *L. monocytogenes* (Tabela 3). Estes resultados indicam que a inibição não foi causada pela ação do ácido lático e nem pela produção de H₂O₂, mas sim por um composto antimicrobiano extracelular.

TABELA 3 – LARGURA DO HALO DE INIBIÇÃO^a (mm) PRODUZIDO PELOS SOBRENADANTES DE BAL SUBMETIDOS A DIFERENTES TRATAMENTOS FRENTE AOS ISOLADOS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Isolado de BAL	Tratamento do Sobrenadante	Isolados de <i>L. monocytogenes</i>			
		ATCC 7644	01	02	03
323	pH =6,5	4	6	8	4
	pH =6,5 + catalase	4	6	8	4
	80°C/ 10 min	3	6	7	3
	100°C/ 20 min	3	6	7	3
484	pH = 6,5	1	4	3	4
	pH = 6,5 + catalase	1	4	3	4
	80°C/ 10 min	1	2	3	3
	100°C/ 20 min	1	2	3	3
485	pH = 6,5	2	4	4	4
	pH = 6,5 + catalase	2	4	4	4
	80°C/ 10 min	2	4	4	3
	100°C/ 20 min	2	4	4	3
505	pH =6,5	1	4	3	4
	pH =6,5 + catalase	1	4	3	4
	80°C/ 10 min	1	2	3	3
	100°C/ 20 min	1	2	3	3

^a Largura do halo de inibição medido da borda da colônia à borda do halo de inibição (mm).

Comparando-se a largura dos halos de inibição obtidos no teste *spot-on lawn* e no ensaio de difusão em poços dos isolados 323, 484, 485 e 505, verificou-se uma redução significativa da atividade antimicrobiana quando são utilizados os sobrenadantes livres de células. CARVALHO *et al.* (2006) obtiveram resultados

semelhantes aos do presente estudo. Das 18 culturas de BAL isoladas de salames obtidos por fermentação espontânea na região Sul do Brasil, apenas uma cultura apresentou atividade antilisteria quando foi utilizado o ensaio de difusão em poços.

A sensibilidade dos isolados de *L. monocytogenes* aos compostos produzidos pelas BAL apresentou variação quando o sobrenadante foi neutralizado e adicionado de catalase, como pode ser observado na Tabela 3. O composto antimicrobiano produzido pelo isolado 323 apresentou menor inibição frente aos isolados de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* 03. Para os demais isolados de BAL, a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644 apresentou menor sensibilidade. A variação da sensibilidade de cepas de *L. monocytogenes* a diferentes bacteriocinas foi relatada por CASTELLANO *et al.* (2001). De acordo com os autores, a constituição da membrana celular, bem como a composição lipídica parecem estar envolvidas na resistência aos compostos antimicrobianos

Os sobrenadantes dos isolados 323, 484, 485 e 505 foram tratados com proteases, objetivando avaliar a natureza proteica do composto inibidor. O tratamento com as enzimas α -quimiotripsina, protease, tripsina e proteinase-K resultou na inativação da atividade antimicrobiana dos sobrenadantes dos 4 isolados de BAL (dados não tabulados). Quando os sobrenadantes foram submetidos ao tratamento térmico (80°C/10 min e 100°C/20 min) não foi observada redução expressiva da atividade inibitória frente aos isolados de *L. monocytogenes* (Tabela 3). Pela Figura 7 observam-se, como exemplo, os halos de inibição frente à *L. monocytogenes* (ATCC 7644) produzidos pelo sobrenadante do isolado 323, submetido a diferentes tratamentos, no ensaio de difusão em poços.

Dessa forma, acredita-se que o composto antimicrobiano produzido pelos isolados 323, 484, 485, e 505 seja uma proteína ou peptídeo termoestável e que apresenta atividade antilisteria, podendo ser classificado como uma bacteriocina pertencente à classe IIa.

A quantificação da produção de bacteriocina produzidas pelos isolados 323, 484, 485 e 505 foi verificada após incubação em caldo MRS a 30°C/24 h. Os resultados da quantificação foram de: 200 UA.ml⁻¹ para o isolado 484; 400 UA.ml⁻¹ para os isolados 485 e 505 e de 800 UA.ml⁻¹ para o isolado 323.

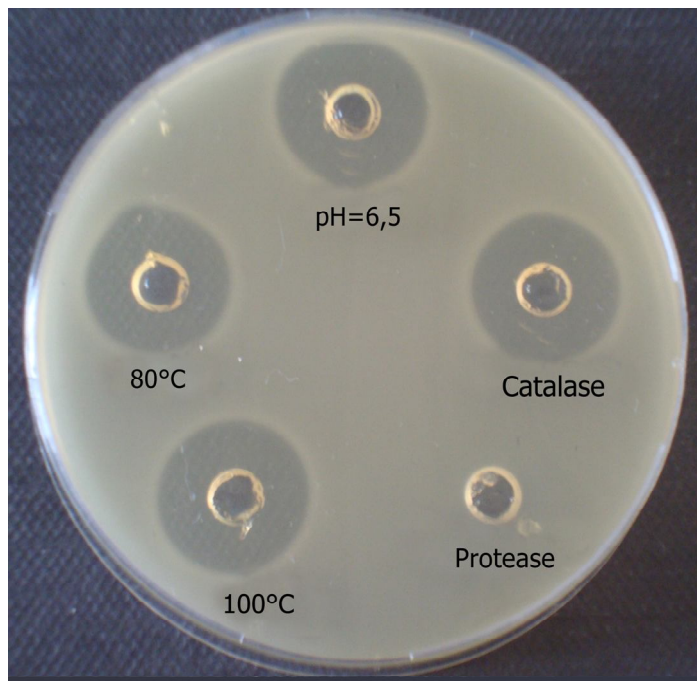


FIGURA 7 – ENSAIO DE DIFUSÃO EM POÇOS DO ISOLADO 323 FRENTE À *L. MONOCYTOGENES* 01

FONTE: A autora (2009)

4.2 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS PRODUTORAS DE BACTERIOCINA

As características metabólicas, de importância tecnológica, dos isolados produtores de bacteriocina estão apresentadas na Tabela 4. Os quatro isolados foram caracterizados como bacilos Gram-positivos, não produtores de catalase e CO_2 . Todos apresentaram habilidade de multiplicação em baixos valores de pH, na presença de altas concentrações de NaCl e na presença de NaNO_2 . A capacidade de multiplicação em baixas temperaturas foi positiva para todos os isolados testados.

O isolado de BAL 323 que apresentou maior produção de bacteriocina (800 UA.ml^{-1}) tem aplicação limitada como cultura *starter* em embutidos cárneos fermentados, devido à expressiva produção de H_2O_2 (Tabela 4). De acordo com BUCKENHÜSKES (1993), a maioria dos *Lactobacillus* é capaz de formar H_2O_2 . O isolado de BAL 505 apresentou capacidade de produzir dextrana e dessa forma não deve ser utilizado como cultura iniciadora em embutidos cárneos. Os isolados 484 e

485 apresentaram características tecnológicas adequadas para produção de embutidos cárneos, sendo que optou-se pela escolha do isolado 485 como cultura *starter* para elaboração de linguiças coloniais visto que apresentou maior capacidade de produção de bacteriocina.

TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS DE BAL PRODUTORAS DE BACTERIOCINA ISOLADAS DE EMBUTIDOS CÁRNEOS PRODUZIDOS POR FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

Características	Isolados			
	323	484	485	505
Coloração de Gram	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Morfologia	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Catalase	-	-	-	-
Produção de CO ₂	-	-	-	-
Produção de H ₂ O ₂	+++	+	+	+
Produção de dextrana	-	-	-	+
pH final (7 dias)	3,87	4,35	4,39	4,40
Multiplicação a:				
8°C	++	++	++	++
15°C	++	++	++	++
37°C	++	++	++	++
45°C	-	++	++	++
Multiplicação em:				
pH = 3	++	+	+	+
pH = 4	++	+	+	+
pH = 5	++	++	++	++
Multiplicação em:				
5% NaCl	++	++	++	++
8% NaCl	++	+	+	+
10% NaCl	++	+	+	+
3% NaCl + 150ppm NaNO ₂	++	++	++	++
+++ fortemente positivo	++ positivo	+ fracamente positivo	- negativo	

4.2.1 Identificação bioquímica

Os resultados da fermentação de diferentes fontes de carbono pelos quatro isolados de BAL produtores de bacteriocinas estão apresentados na Tabela 5. Os dados obtidos na fermentação das diferentes fontes de carbono foram analisados pelo programa APILAB PLUS e os quatro isolados de BAL foram identificados como *Lactobacillus plantarum* (Tabela 6).

TABELA 5 – PERFIL BIOQUÍMICO DOS ISOLADOS DE BAL PRODUTORES DE BACTERIOCINA

<i>Fonte de Carbono</i>	<i>Isolados de BAL avaliados</i>			
	323	484	485	505
Controle	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-
D- arabinose	-	-	-	-
L- arabinose	+	-	+	+
D- ribose	+	+	+	+
D- xilose	-	-	-	-
L- xilose	-	-	-	-
D- adonitol	-	-	-	-
Metil-β-D-xilopiranosídeo	-	-	-	-
D- galactose	-	+	+	+
D- glicose	+	+	+	+
D- frutose	+	+	+	+
D- manose	+	+	+	+
L- sorbose	-	-	-	-
L- ramnose	+	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
D- manitol	+	+	+	+
D- sorbitol	+	+	-	-
Metil-αD-manopiranosídeo	+	+	+	+
Metil-αD-glucopiranosídeo	-	-	-	-
N-acetilglucosamina	+	+	+	+
Amigdalina	+	+	+	+
Arbutina	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+
D-celobiose	+	+	+	+
D-maltose	+	+	+	+
D-lactose	+	+	+	+
D-melibiose	+	+	+	+
D-sacarose	+	+	+	+
D-trealose	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-
D-melezitose	+	+	-	-
D- rafinose	+	+	+	+
Amido	-	-	-	-
Glicogênio	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-
Gentiobiose	+	+	+	+
D- turanose	-	-	-	-
D-lixose	-	-	-	-
D- tagtose	+	-	+	+
D- fucose	-	-	-	-
L- fucose	-	-	-	-
D- arabitól	-	+	-	-
L- arabitól	-	-	-	-
Gluconato de potássio	-	+	-	-
2- cetogluconato de potássio	-	-	-	-
5- cetogluconato de potássio	-	-	-	-

+ reação positiva - reação negativa

TABELA 6 - RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE BAL DE ACORDO COM O PERFIL BIOQUÍMICO APRESENTADO

Isolado	Classificação	Probabilidade (%)	Identificação
323	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9	Muito boa
484	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9	Muito boa
485	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98,2	Boa
505	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98,2	Boa

4.3 ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE MATURAÇÃO DA LINGUIÇA COLONIAL

4.3.1 pH

A evolução dos valores de pH nos embutidos fermentados durante o período de maturação e secagem está representada na Figura 8. Os valores de pH inicial (dia 0) dos tratamentos inoculados com *L. plantarum* (Bac^- e Bac^+) não diferiram estatisticamente ($P > 0,01$) do tratamento controle, apresentando valores de 5,98, 5,78 e 5,82, respectivamente. O pH inicial da massa inferior a 5,8 favoreceu a multiplicação das bactérias lácticas nos embutidos fermentados.

A queda do pH nos embutidos fermentados para valores próximos a 5,0 nos primeiros dias de fermentação torna o ambiente protegido contra a ação de bactérias Gram-negativas indesejáveis, constituindo a base para sua inocuidade microbiológica (LÜCKE, 2000; ERKKILÄ *et al.*, 2001; TYÖPPÖNEN *et al.*, 2003).

Após 5 dias de fermentação o pH do tratamento inoculado com *L. plantarum* Bac^- reduziu de 5,98 para 4,69. No tratamento inoculado com *L. plantarum* Bac^+ houve redução do pH de 5,78 para 4,71. Os valores de pH de ambos os tratamentos mantiveram-se até o 19º dia de processamento não sendo observada diferença significativa ($P > 0,01$) entre os tratamentos, indicando que a produção de ácido láctico pelas culturas foi semelhante. TYÖPPÖNEN *et al.* (2003) observaram valores semelhantes de decréscimo do pH em salames fermentados por uma cepa *L. plantarum* bioprotetora. Foi verificada redução do pH de 5,70 para 4,73 após o 7º dia de maturação e após 21 dias de maturação o pH foi de 4,90.

No tratamento controle (não inoculado com BAL) foi observado acréscimo no valor do pH, de 5,82 para 6,13 ao final do processamento. Os valores de pH durante os 19 dias de processamento foram estatisticamente diferentes ($P < 0,01$) entre os tratamentos inoculados com *L. plantarum* (Bac^- e Bac^+) e o tratamento controle. CAMPANINI *et al.* (1993) também verificaram que os valores de pH em salame não inoculado com culturas de *L. plantarum*, não apresentaram decréscimo durante o processo de maturação, sendo que os valores mantiveram-se entre 5,7 e 5,8.

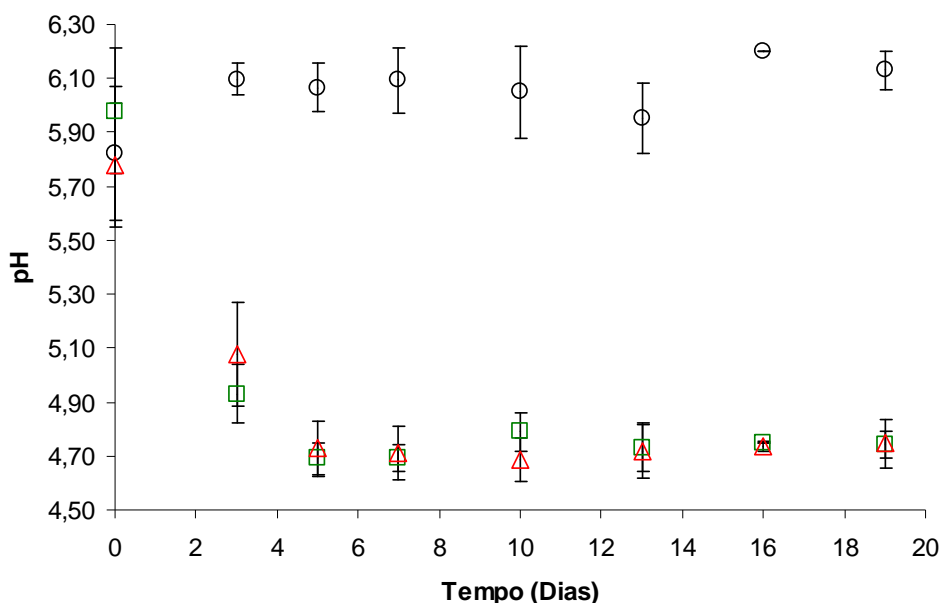


FIGURA 8 – EVOLUÇÃO DO pH DURANTE MATURAÇÃO DE LINGUIÇA COLONIAL

Identificação dos tratamentos: ○ – Controle; □ – *L. plantarum* Bac^- ; △ – *L. plantarum* Bac^+ . Valores apresentados são a média das três repetições. As barras verticais representam o erro padrão

Nos embutidos cárneos, a queda do pH ocorre fundamentalmente pelo acúmulo de ácido láctico, resultante da metabolização dos carboidratos adicionados na massa cárnea, que ocorre durante a etapa de fermentação por ação das bactérias lácticas (LÜCKE, 2000).

A redução do pH durante o processamento dos embutidos proporciona redução na capacidade de retenção de água da carne, facilitando a secagem do produto e reduzindo sua atividade de água (TYÖPPÖNEN *et al.*, 2003), além de fornecer condições para as reações de formação da cor.

Nos embutidos produzidos com a adição de culturas *starter*, a redução do pH é mais significativa e estável, mesmo que a quantidade de bactérias lácticas no produto final seja similar. Isso ocorre devido à maior capacidade de acidificação das culturas *starter* em relação à microbiota nativa (SANZ *et al.*, 1997).

4.3.2 Atividade de água

Os valores encontrados de atividade de água durante a maturação das linguiças coloniais estão apresentados na Figura 9. Os embutidos apresentaram redução gradual da a_w , mostrando declínio semelhante para os tratamentos até o final do processamento, sendo que os valores não apresentaram diferença estatística significativa ($P > 0,01$).

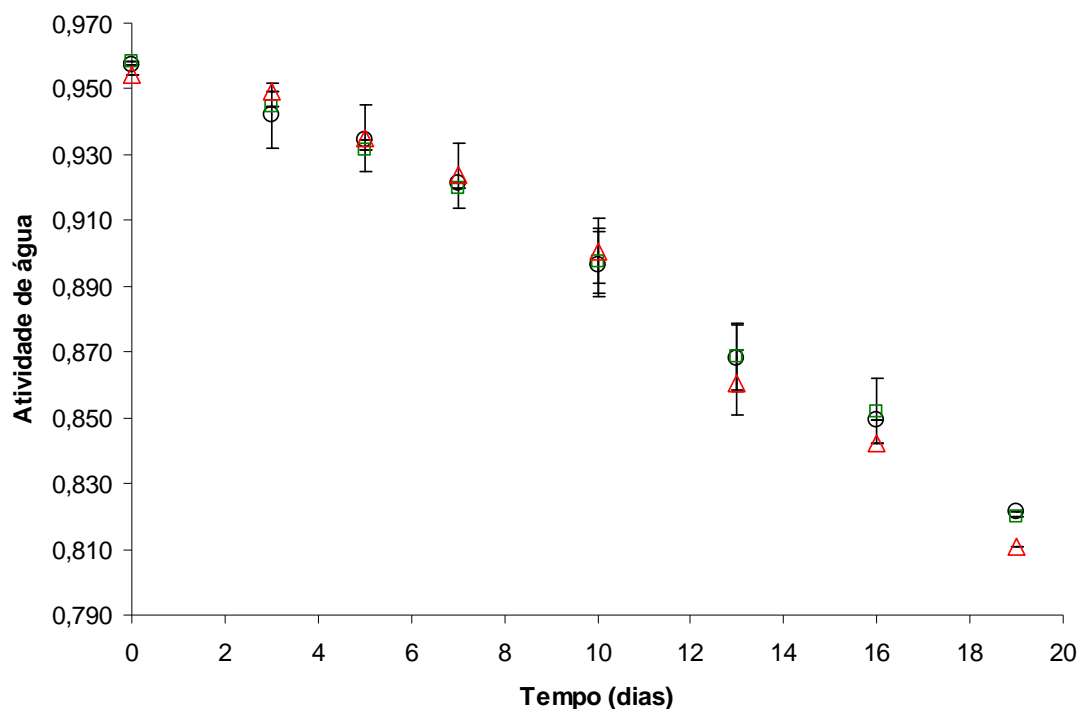


FIGURA 9 – EVOLUÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA DURANTE MATURAÇÃO DE LINGUIÇA COLONIAL

Identificação dos tratamentos: ○ – Controle; □ – *L. plantarum* Bac⁻; △ – *L. plantarum* Bac⁺. Valores apresentados são a média das três repetições. As barras verticais representam o erro padrão

A pequena redução na a_w das linguiças coloniais até o 3º dia está relacionada com as condições de processamento da câmara de fermentação/maturação. A umidade relativa é um dos fatores que interferem na desidratação, cabendo ressaltar que neste período a umidade relativa foi superior a 90%. Durante o período de maturação (7º-19º dia), a umidade da câmara foi mantida a 75% para facilitar o processo de desidratação e, conseqüentemente, reduzir a atividade de água, conforme foi verificado por DALLA SANTA (2008).

4.3.3 Umidade e perda de peso

Na Figura 10 estão dispostas as porcentagens da umidade e perda de peso durante o processamento das linguiças coloniais. Durante a etapa de maturação ocorre a redução da umidade, assim como o desenvolvimento da textura, do sabor e aroma. A umidade responde, em parte, pelas características sensoriais, pois as reações de lipólise e proteólise necessitam de meio aquoso para ocorrer, influenciando a cor, textura e firmeza do produto cárneo (TERRA; FRIES; TERRA, 2004). A variação da umidade nos produtos cárneos depende de parâmetros externos como a umidade relativa e a renovação do ar na câmara de maturação, além de fatores internos como a superfície do tecido magro, pH e teor de gordura do produto (CICHOSKI; TERRA; FREITAS, 2004).

Os teores de umidade obtidos para os embutidos dos tratamentos controle, inoculado com *L. plantarum* Bac⁻ e *L. plantarum* Bac⁺ ao final do processamento foram 30,67%, 30,06% e 28,07%. Os embutidos dos três tratamentos mostraram perfil semelhante de redução de umidade, sendo que os valores de umidade não diferiram significativamente ($P > 0,01$) entre os tratamentos durante o tempo de maturação.

A perda de peso do produto cárneo caracteriza a perda de água e substâncias hidrossolúveis, tendo em vista a acidificação do produto durante a fase de fermentação. Ao atingir o ponto isoelétrico das proteínas miofibrilares, ocorre a liberação em maior quantidade desta água. A desidratação é essencial para a inocuidade e qualidade do produto, e auxilia na obtenção das características sensoriais do produto cárneo (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

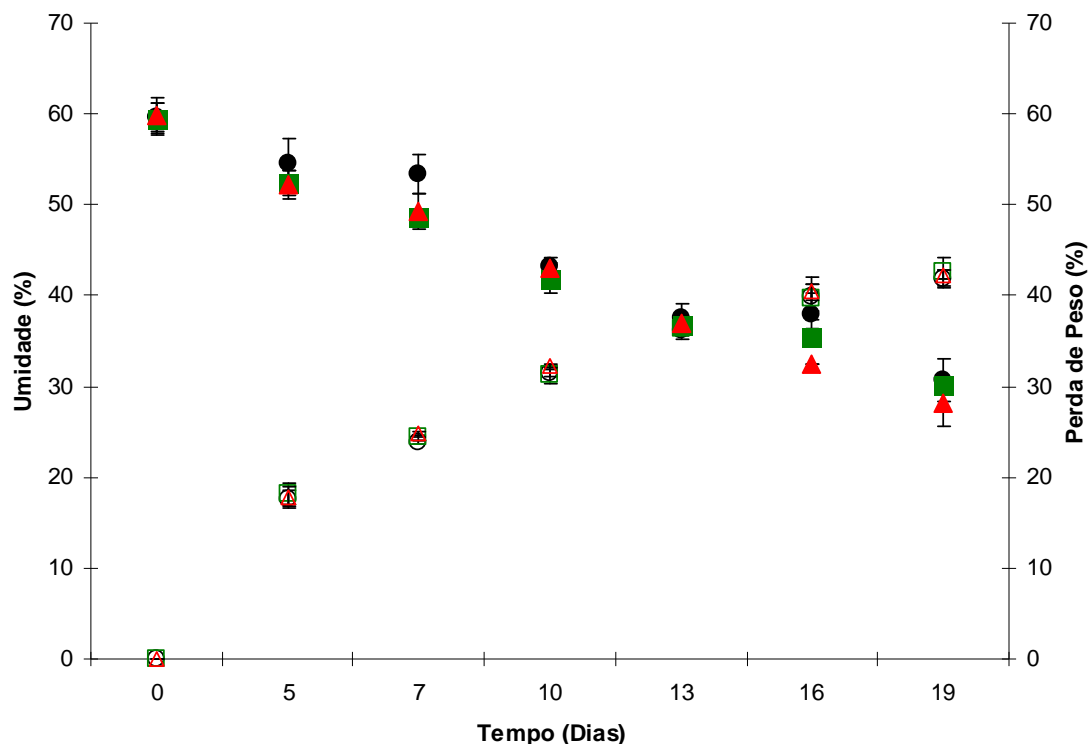


FIGURA 10 – EVOLUÇÃO DA UMIDADE E PERDA DE PESO DURANTE MATURAÇÃO DE LINGUIÇA COLONIAL

Identificação dos tratamentos: ● – Controle; ■ – *L. plantarum* Bac⁻; ▲ - *L. plantarum* Bac⁺; Porcentagem de umidade (símbolos preenchidos) e de perda de peso (símbolos vazios). Valores apresentados são a média das três repetições. As barras verticais representam o erro padrão.

A determinação da perda de peso é uma medida que mostra indiretamente a quantidade de água eliminada pelo embutido durante o período de secagem e depende da temperatura, umidade relativa no interior da câmara de maturação e do tempo de processamento (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000).

Pela análise dos resultados obtidos, não foi verificada diferença estatística significativa ($P > 0,01$) para a perda de peso entre os tratamentos durante a maturação de linguiça colonial

Valores semelhantes foram obtidos por GARCIA, GAGLEAZZI e SOBRAL (2000) que verificaram perda de peso ao final do processamento (20 dias) de salame tipo italiano de 44%.

4.4 ALTERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS OCORRIDAS DURANTE O PROCESSAMENTO DE LINGUIÇA COLONIAL

4.4.1 Bactérias lácticas

A evolução da população de bactérias lácticas em linguiças coloniais está apresentada na Figura 11. No início da fermentação os tratamentos não inoculados com culturas *starter* (controle e inoculado com *L. monocytogenes*) apresentaram contagens de 2,95 e 3,43 log UFC.g⁻¹, respectivamente. De acordo com COPPOLA *et al.* (2000) e PAPAMANOLLI *et al.* (2003) embutidos produzidos sem a adição de cultivos iniciadores, a contagem de BAL é inferior a 4 log UFC.g⁻¹ no início da fermentação. Valores similares foram obtidos no presente trabalho.

Já os tratamentos inoculados com culturas iniciadoras apresentaram uma contagem inicial de BAL que variou de 6,33 a 6,64 log UFC.g⁻¹, a qual foi significativamente (P<0,01) superior aos tratamentos não inoculados.

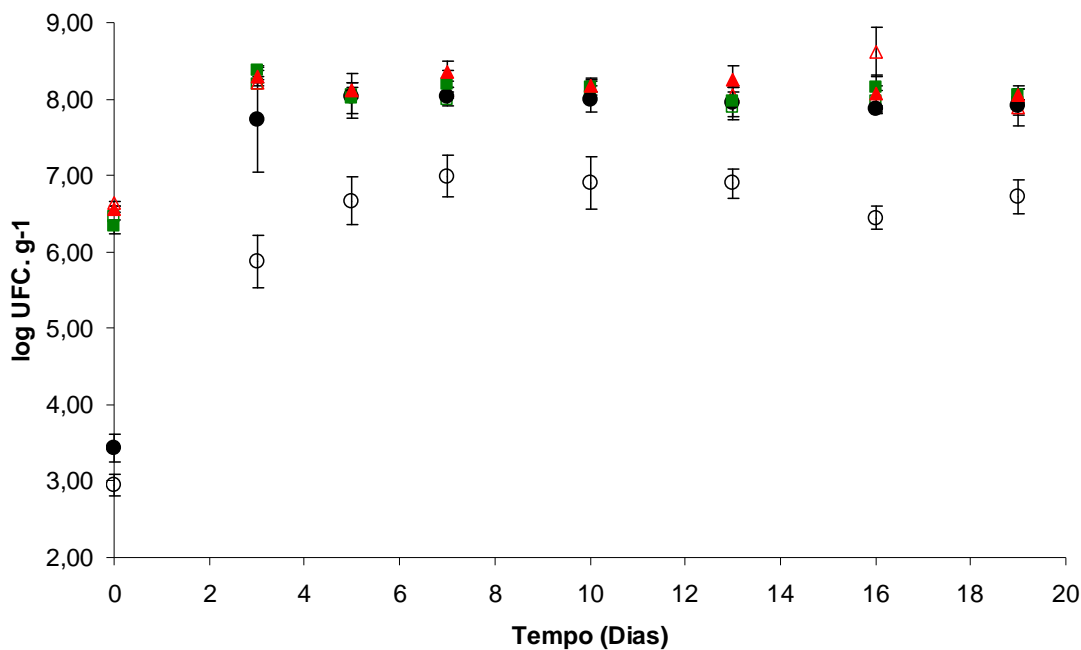


FIGURA 11 – EVOLUÇÃO DA CONTAGEM DE BAL DURANTE MATURAÇÃO DE LINGUIÇA COLONIAL

Identificação dos tratamentos: ○ – Controle; □ – *L. plantarum* Bac⁻; △ – *L. plantarum* Bac⁺; ● – *L. monocytogenes*; ■ – *L. monocytogenes* + *L. plantarum* Bac⁻; ▲ – *L. monocytogenes* + *L. plantarum* Bac⁺. Valores apresentados são a média das três repetições. As barras verticais representam o erro padrão

Após 7 dias de processamento o tratamento controle apresentou contagem de BAL de aproximadamente $7 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Essa população manteve-se até o final do processo de maturação e foi significativamente inferior ($P < 0,01$) aos demais tratamentos.

Nos tratamentos adicionados de cultura *starter* e no tratamento adicionado somente do *pool* de *L. monocytogenes*, foi observada contagem superior a $8 \log \text{UFC.g}^{-1}$ após 3 dias de processamento. Os valores mantiveram-se até o final do processamento, não apresentando diferença significativa ($P > 0,01$) entre os tratamentos.

Contagens semelhantes de *L. plantarum* em embutidos cárneos fermentados foram observados em estudos realizados por TYÖPPÖNEN *et al.* (2003) e SAWITZKI *et al.* (2008).

As contagens de BAL durante o processo de maturação foram significativamente superiores ($P < 0,01$) nos tratamentos adicionados de cultura *starter* quando comparados com o tratamento controle. Estes resultados indicam que os isolados de *L. plantarum* Bac^- e *L. plantarum* Bac^+ são capazes de se multiplicar em linguiças coloniais e competir com a microbiota contaminante. De acordo com SCHILLINGER e LÜCKE (1989) bactérias lácticas isoladas de salames obtidos por fermentação espontânea são os micro-organismos mais indicados para serem utilizados na intensificação da inocuidade destes alimentos. Segundo os autores, estas bactérias são adaptadas às condições dos embutidos e devem, desta forma, ser mais competitivas comparativamente às bactérias lácticas provenientes de outras fontes.

4.4.2 *Listeria monocytogenes*

4.4.2.1 Comportamento de *L. monocytogenes* nos tratamentos artificialmente contaminados

Durante a maturação das linguiças coloniais, nos tratamentos inoculados somente com o *pool* de *L. monocytogenes* foi verificada a multiplicação do patógeno,

como pode ser observado na Figura 12. A contagem inicial foi de 3,62 log UFC.g⁻¹ e no 5º dia de processamento a população de *L. monocytogenes* atingiu a contagem máxima de 6,21 log UFC.g⁻¹. Ao final da etapa de maturação, a diferença entre a população final e inicial foi de 5,63 log UFC.g⁻¹, sendo que o incremento na população de *L. monocytogenes* foi de 2,01 log UFC. g⁻¹. As contagens obtidas nos diferentes tempos de maturação avaliados no tratamento inoculado somente com o *pool* de *L. monocytogenes*, foram significativamente (P<0,01) superiores às obtidas nos tratamentos inoculados com cultura *starter*.

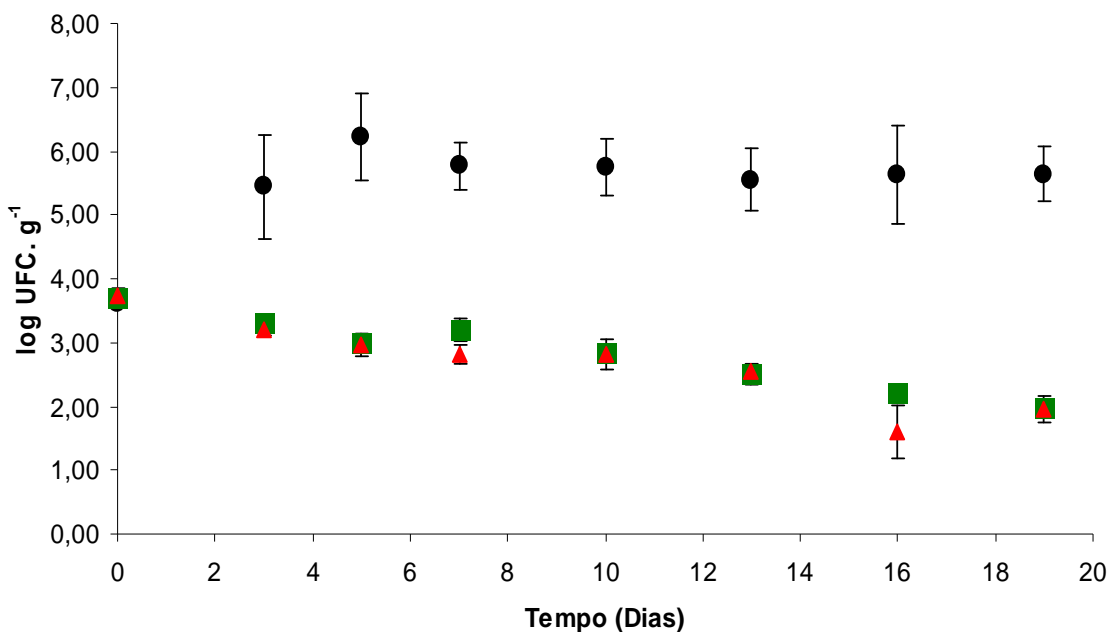


FIGURA 12 - COMPORTAMENTO DE *L. MONOCYTOGENES* DURANTE MATURAÇÃO DE LINGUIÇA COLONIAL

Tratamentos inoculados com *pool* de *Listeria monocytogenes*, ● – Controle ■ – BAL Bac⁻ ▲ - BAL Bac⁺. Valores apresentados são a média das três repetições. As barras verticais representam o erro padrão.

Estudos realizados sobre o comportamento de *L. monocytogenes* durante maturação de embutidos fermentados têm variado consideravelmente. DEGENHARDT; SANT'ANNA (2007) avaliaram o comportamento de *L.monocytogenes* ATCC 7644 em salame italiano produzido sob condições brasileiras de fabricação. No tratamento inoculado somente com *L. monocytogenes* (contagem inicial aproximada de 4 log UFC.g⁻¹) não foi verificado o aumento da população do patógeno no produto. Após 28 dias de processamento, a diferença entre a população inicial e final de *L. monocytogenes* foi de 2,57 log. Em estudo

desenvolvido por BENKERROUM *et al.* (2005) também não foi observada a multiplicação de *L. monocytogenes* em embutidos fermentados sem a adição de cultura *starter*. As contagens iniciais de 2,69 log UFC.g⁻¹ foram reduzidas para valores inferiores a 1 log UFC.g⁻¹ após 19 dias de maturação.

FARBER *et al.* (1993) verificaram aumento de 0,5 log na contagem de *L. monocytogenes* em salame tipo italiano produzido sem a adição de cultura *starter*. CAMPANINI *et al.* (1993) também observaram moderada multiplicação do patógeno em salames inoculados somente com *L. monocytogenes*. O incremento na população foi de 1 log após 14 dias de processamento.

Embora alguns estudos tenham verificado a eficiência do processo de produção de embutidos fermentados em controlar a multiplicação de *L. monocytogenes*, os resultados destes estudos variam consideravelmente. Atribuem-se a essas variações tanto os parâmetros de temperatura e umidade utilizados nas etapas de fermentação e secagem, bem como as características das cepas de *L. monocytogenes* utilizadas em cada experimento (NIGHTINGALE *et al.*, 2006).

THÉVENOT *et al.* (2005) verificaram que a redução da contagem inicial de *L. monocytogenes* durante a maturação de embutidos depende da cepa utilizada como inóculo. Embutidos inoculados (4 log UFC.g⁻¹) com cepas de *L. monocytogenes* isoladas de humanos apresentaram redução de 3 log da população. Quando inoculados com cepas isoladas de embutidos e da superfície de equipamentos foi observada redução de 1,5 log da população do patógeno. A menor redução da população de *L. monocytogenes* isoladas de embutidos e da superfície de equipamentos, pode ser explicada pela adaptação adquirida destes isolados aos obstáculos presentes em embutidos fermentados.

O presente estudo verificou um alto incremento na população de *L. monocytogenes* (2,01 log) inoculadas em linguiças coloniais, quando comparado com estudos anteriores (FARBER *et al.*, 1993; CAMPANINI *et al.*, 1993). O inóculo de *L. monocytogenes* utilizado na elaboração de linguiças coloniais, foi composto de uma cepa ATCC 7644 e três culturas isoladas de embutidos cárneos fermentados. A possível adaptação destas culturas aos obstáculos presentes em embutidos fermentados (baixo pH, baixa a_w, e alta concentração de NaCl), pode ter contribuído para a multiplicação do patógeno no produto.

Nos tratamentos inoculados com cultura *starter* de *L. plantarum* produtor de bacteriocina (Bac⁺) e não produtor de bacteriocina (Bac⁻) foi verificada redução na

população de *L. monocytogenes* durante a maturação de linguiças coloniais, o que não se observou no tratamento sem *L. plantarum*. A redução na população de *L. monocytogenes* para o tratamento adicionado de *L. plantarum* Bac⁻ foi de 1,71 log e de 1,79 log para o tratamento adicionado de *L. plantarum* Bac⁺, não sendo observada diferença estatística significativa ($P > 0,01$) entre eles. Resultados semelhantes obtidos no presente estudo também foram observados por CAMPANINI *et al.* (1993). A utilização de cultura starter de *L. plantarum* produtor de bacteriocina em salame artificialmente contaminado com *L. monocytogenes* (4 log UFC.g⁻¹), não reduziu significativamente a população do patógeno, quando comparado à cultura não bacteriocinogênica.

Em trabalho realizado por BENKERROUM *et al.* (2005) foi verificada a inibição de *L. monocytogenes* em embutidos fermentados pela produção *in situ* de bacteriocinas pelas culturas de *Lactobacillus curvatus* e *Lactococcus lactis*. Quando a cultura de *L. curvatus* foi utilizada como *starter*, a contagem de *L. monocytogenes* foi reduzida a valores < 1 log UFC.g⁻¹ após 12 h de fermentação. O patógeno não foi detectado após o 12º dia de secagem do embutido.

TYÖPPÖNEN *et al.* (2003) também verificaram a eficiência da adição de culturas bioprotetoras (*L. plantarum* e *L. rhamnosus*) na inibição de *L. monocytogenes* em embutidos cárneos fermentados. Salames adicionados das culturas bioprotetoras apresentaram ausência de *L. monocytogenes* no 7º dia de processamento, enquanto que salames elaborados com culturas *starters* comerciais, a ausência do patógeno só foi observada no 28º dia de maturação.

Nesse estudo, esperava-se que a redução da contagem de *L. monocytogenes* no tratamento adicionado de cultura *starter* produtora de bacteriocina fosse superior ao controle negativo (*L. plantarum* Bac⁻), isto porque os resultados *in vitro* demonstraram a produção de bacteriocina pelo isolado de *L. plantarum* e a inibição do *pool* de *L. monocytogenes*. No entanto, a atividade bacteriocinogênica não foi detectada quando o isolado foi inoculado em linguiça colonial.

Estudos demonstram que a atividade bacteriocinogênica de bactérias lácticas é menor em alimentos quando comparado com resultados obtidos *in vitro* (SHILLINGER; KAYA; LÜCKE, 1991). A atividade é reduzida devido a alguns fatores como: a baixa produção de bacteriocinas, instabilidade genética, desuniformidade na distribuição da bacteriocina no alimento, baixa solubilidade da bacteriocina, inativação por proteases e a adsorção à proteínas e gordura do alimento.

(SCHILLINGER; GEISEN; HOLZAPFEL, 1996, LEROY; VERLUYTEN; DE VUTST, 2006).

Relacionando os parâmetros físico-químicos das linguiças coloniais durante a maturação e o comportamento de *L. monocytogenes*, verificou-se que somente os valores de pH apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. No tratamento em que não foi adicionada cultura *starter* os valores de pH permaneceram entre 6,07 e 6,10, estes valores elevados de pH durante o processamento contribuíram, provavelmente, para a multiplicação e manutenção de *L. monocytogenes* no produto, como pode ser observado na Figura 13.

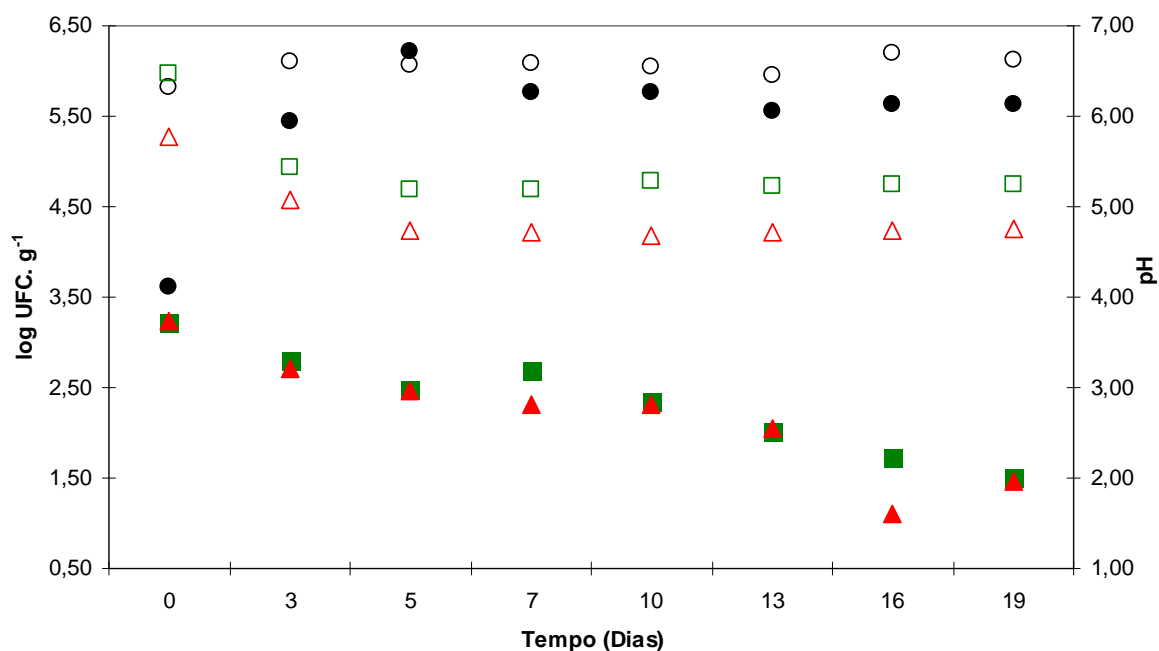


FIGURA 13 - COMPORTAMENTO DE *L. MONOCYTOGENES* E VALORES DE PH DURANTE MATURAÇÃO DE LINGUIÇA COLONIAL

Tratamentos inoculados com *pool* de *Listeria monocytogenes*, ● – Controle ■ – *L. plantarum* Bac⁻ ▲ - *L. plantarum* Bac⁺. Contagem de *L. monocytogenes* (símbolos preenchidos) e valores de pH (símbolos vazios). Valores apresentados são a média das três repetições.

A adição de culturas *starter* em linguiças coloniais promoveu redução do pH da massa cárnea para valores próximos a 4,7 durante a primeira semana da etapa de maturação (Figura 13). Os valores baixos de pH foram suficientes para reduzir a população de *L. monocytogenes*, porém não eliminou o patógeno, que pôde ser recuperado após 19 dias de maturação, apresentando contagens de 2 log UFC.g⁻¹

para o tratamento adicionado de *L. plantarum* Bac⁻ e 1,95 log UFC.g⁻¹ para o tratamento adicionado de *L. plantarum* Bac⁺.

A atividade de água ao final do processamento de linguiças coloniais variou entre 0,811 e 0,821, valores bem inferiores ao mínimo de 0,90 a 0,91 necessários para a multiplicação da maioria dos micro-organismos. Os baixos valores de a_w atingidos durante a maturação do produto, não foram suficientes para reduzir a contagem de *L. monocytogenes*. Mesmo fato foi observado para os parâmetros de umidade e perda de peso.

Embora seja improvável que a contaminação inicial de embutidos seja de aproximadamente 4 log UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes*, a manutenção da matéria-prima em temperatura abusiva, bem como a contaminação cruzada durante o processamento podem resultar em uma carga elevada de *Listeria* sp. Ainda que a contagem de *Listeria* sp. em carne suína seja menor que 2 log UFC.g⁻¹, (FARBER; PETERKIN, 1991; THÉVENOT *et al.*, 2005) estudos têm demonstrado um alta prevalência de contaminação de carne suína por *Listeria* sp (NIGHTINGALE *et al.*, 2006). Em estudo conduzido em 13 plantas de processamento de embutidos na França, THÉVENOT *et al.* (2005) encontraram 33,9% de carne suína contaminada por *L. monocytogenes* e a contaminação após as etapas de moagem e embutimento atingiu valores de 71,6%, indicando que é comum a presença do patógeno nas matérias-primas utilizadas para a fabricação de embutidos fermentados.

4.4.2.2 Comportamento de *L. monocytogenes* nos tratamentos naturalmente contaminados

Os tratamentos controle e adicionado das culturas *starter* de *L. plantarum* (tratamentos A, C e E), representam o comportamento da população de *L. monocytogenes* presente na matéria-prima (contaminação natural) utilizada na produção de linguiça colonial. Os resultados da detecção de *L. monocytogenes* estão apresentados na Figura 14.

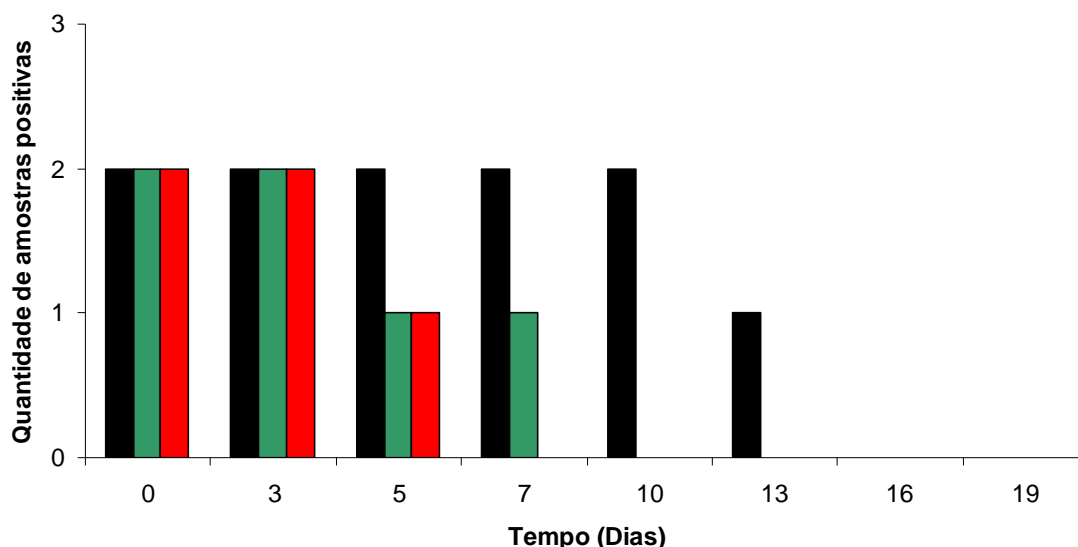


FIGURA 14 – NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA *L. MONOCYTOGENES* DURANTE MATURAÇÃO DE LINGUIÇA COLONIAL NATURALMENTE CONTAMINADA
 Identificação dos tratamentos: ■ – Controle ■ – *L. plantarum* Bac⁻ ■ – *L. plantarum* Bac⁺.

Todos os tratamentos apresentaram contaminação inicial por *L. monocytogenes*, resultados também observados por DEGENHARDT e SANT'ANNA (2007) na elaboração de salame tipo italiano. A adição de cultura *starter* de *L. plantarum* apresentou efeito inibitório frente às culturas de *L. monocytogenes* naturalmente presentes em linguiças coloniais. A ausência de *L. monocytogenes* pôde ser observada a partir do 7° dia do processamento de linguiças coloniais, enquanto que no tratamento controle a inibição do micro-organismo ocorreu após o 13° dia de maturação.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça Colonial (BRASIL, 2000) não estabelece valores máximos de umidade e atividade de água e valores mínimos de pH para linguiças coloniais. A falta destes parâmetros físico-químicos permite que estes produtos sejam comercializados antes de atingirem o nível de maturação adequado, constituindo perigo considerável à saúde dos consumidores.

Os valores máximos de atividade de água e umidade estão definidos para os demais embutidos fermentados regulamentados pela Instrução Normativa n° 22 (BRASIL, 2000). Tomando como exemplo o Anexo V, que regulamenta a identidade e qualidade de salame, tem-se que a atividade de água máxima permitida é de 0,92 e a umidade máxima de 40%. Utilizando estes parâmetros para determinar o término

do processo de maturação de linguiças coloniais, o valor da atividade de água seria atingido entre o 7° e 10° dia de maturação (Figura 9, pág 64) e de umidade entre o 10° e 13° dia (Figura 10, pág 66). Porém, nota-se pela Figura 14, que até o 13° dia de processamento foi detectada a presença de *L. monocytogenes* no tratamento controle. A ausência do micro-organismo, neste tratamento, somente foi observada após o 16° dia de maturação, quando os valores de atividade de água e umidade eram de 0,850 e 37,89%, respectivamente.

Os baixos valores de pH apresentados pelos tratamentos inoculados com cultura *starter* foram os responsáveis pela inibição do patógeno, visto que este parâmetro foi o único que apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Figura 8, pág 63).

Dessa forma, fica evidenciada a necessidade da inclusão dos parâmetros físico-químicos no regulamento técnico de identidade e qualidade de linguiças coloniais e principalmente a importância da inserção do valor mínimo de pH, para garantir a inocuidade de linguiças coloniais.

5 CONCLUSÕES

Culturas de bactérias láticas isoladas de embutidos obtidos por fermentação espontânea apresentaram baixa atividade antimicrobiana direta frente a *L. monocytogenes* e diminuta produção de compostos semelhantes à bacteriocinas.

A baixa incidência de isolamento de BAL em embutidos fermentados com atividade inibitória frente à *L. monocytogenes* é um dado relevante do ponto de vista de saúde pública. A atividade antilisteria é uma característica muito importante na seleção de BAL como cultura *starter* em embutidos cárneos, pois os salames são produtos prontos para o consumo e que podem ser veículos de *L. monocytogenes*.

A adição de cultura *starter* de *L. plantarum* em linguiças coloniais promoveu redução significativa de *L. monocytogenes*, independentemente da produção ou não de bacteriocinas no produto.

A ausência da cultura de *L. plantarum* permitiu a multiplicação significativa de *L. monocytogenes* em linguiça colonial elaborada, independentemente dos parâmetros físico-químicos estudados que, isoladamente ou em conjunto, não permitiram o controle do patógeno.

A inoculação de *L. plantarum* produtor ou não de bacteriocinas mostrou eficiência significativa no tempo inibição de *L. monocytogenes* naturalmente presente em linguiça colonial quando comparado ao mesmo produto sem cultura *starter*, cuja inibição foi considerada tardia.

Neste sentido, a adição de culturas *starter* em linguiças coloniais deve ser considerada como o principal obstáculo ao desenvolvimento de *L. monocytogenes*, podendo seu efeito ser potencializado pelos obstáculos decorrentes do processo de fabricação do produto.

6 REFERENCIAS

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

ALBANO, H.; 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, p. 796-800, 2006.

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

AMMOR, M. S.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional *starter* cultures in dry sausage production: an update. **Meat Science**, v.76, p. 138-146, 2007.

AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1- Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control**, v. 17, p. 454-461, 2006.

AOAC – **Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis**. 17 ed. Washington, 2000. 1219 p.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN,S.; WRIGHT, A.;OUWEHAND, A. ed. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 2004.

AYMERICH, M. T; HUGAS, M.; MONFORT, J.M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. **Food Science and Technology International**, v .4, p.141-158, 1998.

BARBUTI, S.; PAROLARI, G. Validation of manufacturing process to control pathogenic bacteria in typical dry fermented products. **Meat Science**, v. 62, p. 323-329, 2002.

BENKERROUM , N. *et al.* Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p.56-63, 2005.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Portaria nº1 de 07 de outubro de 1981, Anexo II. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 13 de outubro de 1981. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18098>>. Acesso em 03 fev. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 22, de 31 de julho de 2000. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 03 de agosto de 2000. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2239>>. Acesso em 29 abr. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996. Resolve aprovar a extensão de uso da nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12.5 mg/kg. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 jan. 1996, Seção 1. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/29_96.htm> Acesso em: 5 jul. 2009.

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

BUCKENHÜSKES, H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as *starter* cultures for various food commodities. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 253- 272, 1993.

CAMPAGNOL, P.C. **Cultura starter produzida em meio de cultura de plasma suíno e antioxidante natural na elaboração de salame**. Santa Maria, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria.

CAMPANINI, M.; PEDRAZZONI, I.; BARBUTI, S.; BALDINI, P. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic-acid bacteria starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 20, p. 169-175, 1993.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 131-149, 1999.

CARVALHO, A. A. T.; PAULA, R. A.; MANTOVANI, H.C.; MORAES, C.A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacteria isolated from Italian salami. **Food Microbiology**, v. 23, p. 213-219, 2006.

CASTELLANO, P.; FARÍAS, M. E.; HOLZAPFEL, W.; VIGNOLO, G. Sensitivity variations of *Listeria* strains to the bacteriocins, lactocin 705, enterocin CRL35 and nisin. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 605-608, 2001.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Listeriosis**. Disponível em http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/listeriosis_gi.html Acesso em: 6 jul. 2009.

CICHOSKI, A. J.; TERRA, N. N.; FREITAS, R. J. S. Teoria dos obstáculos (hurdle technology) em produtos cárneos curados. **Higiene Alimentar**, v. 18, p. 33-36, 2004.

CINTAS, L. M.; CASAUS, M. P.; HERRANZ, C.; NES, I.F.; HERNÁNDEZ, P.E. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology International**, v.4, p. 281-305, 2001.

CHASCO, J.; LIZASO, G.; BERIAIN, M.J. Cured color development during sausage processing. **Meat Science**, v.44, n. 3, p. 203-211, 1996.

COPPOLA, S.; MAURIELLO, G.; APONTE, M.; MOSCHETTI, G.; VILLANI, F. Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage. **Meat Science**, v. 56, p. 321-329, 2000.

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

DALLA SANTA, O.R. **Avaliação da qualidade de salames artesanais e seleção de culturas starter para a produção de salame tipo italiano**. Curitiba, 2008. Tese

de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná.

DEGENHARDT, R.; SANT'ANNA, E. B. Pesquisa de *Listeria* sp em embutidos cárneos fermentados produzidos na região meio-oeste de Santa Catarina. **Boletim do CEPPA**, v. 25, n.1, p. 133-140, 2007.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HECHARD, Y.; McMULLEN, L. M.; PREVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; XIRAPHI, N.; MOSCHONAS, G.; GAITIS, F.; METAXOPOULOS. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v. 69, p. 307-317, 2005.

ELORTONDO, F. J; SALMERÓN, J.; ALBISU, M.; CASAS, C. Formación de películas biológicas en la industria alimentaria. **Food Science and Technology International**, v. 5, p. 25-30, 1999.

ERKKILÄ, S; PETÄJÄ, E; EEROLA, S.;LILLEBERG, L.; MATTILA- SANDHOLM, T.; SUIHKO, M. L. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. **Meat Science**, v. 58, p. 111-116, 2001.

FABER, J. M; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FARBER, J.M; DALEY, E.; HOLLEY, R.; USBORNE, W.R. Survival of *Listeria monocytogenes* during the production of uncooked German, American and Italian-style fermented sausages. **Food Microbiology**, v.10, p.123-132, 1993.

FERNÁNDEZ, M.; ORDÓÑEZ, J.; HERRANZ, J.M.; HOZ, L. Accelerated ripening of dry fermented sausages. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 201-209, 2000.

FONTÁN, M. C. G; LORENZO, J. M; MARTÍNEZ, S.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. Microbiological characteristics of Botillo, a Spanish traditional pork sausage, **LWT**, v. 40, p. 1610-1622, 2007.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. *Listeria*: a food pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 1-15, 2007.

GARCIA, F.; GAGLEAZZI, U. A.; SOBRAL, P. J. Variação das propriedades físicas e químicas do salame tipo italiano durante secagem e fermentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.3, p. 151-158, 2000.

GARRIGA, M.; HUGAS, M. ; AYMERICH, T.; MONFORT, J. M. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.142-148, 1993.

GOTTARDO, E.T; VIANA, C.; RIBEIRO, A.S; ERBERT, S.C.; BURIN, R.C.; ZANETTE, C;M; BARCELLOS, V.C; BERSOT, L.S. Embutidos cárneos curados fermentados crus fabricados artesanalmente como veículos de microrganismos patogênicos de importância para saúde pública. **Higiene Alimentar**, v. 23, n. 170/171, p. 349, 2009.

GRIS, E. F.; BORTOLUZZI, R.; SANTO, M.; DAMIAN, C. Produtos Fermentados. **Revista Nacional da Carne**, n. 380, 2002.

HAMMES, W.; BANTLEON, A.; MIN, S. Lactic acid bacteria en meat fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 87, p. 165-174, 1990

HAMMES, W.P; HERTEL, C. New developments in meat *starter* cultures. **Meat Science**, v. 49, p. 125-138, 1998.

HARRIS, L. J; DAESCHEL, M. A; STILES, M. E; KLAENHAMMER, T. R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 384-387, 1989.

HELANDER, I. M; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T-M. Potential of latic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 146-150, 1997.

HITCHENER, B. J.; EGAN, A. F.; ROGERS, P. J. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 52, p. 31-37, 1982.

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

HONIKEL, K. O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, v.78, p. 68-76, 2008.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T.; MONFORT, J. M. Biochemical characterization of Lactobacilli from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, v. 18, p. 107-113, 1993.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T.; MONFORT, J.M. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC 494. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, p. 322-330, 1995.

HUGAS, M.; MONFORT, J. M. Bacterial *starter* culture form meat fermentation. **Food Chemistry**, v. 59, p. 547-554, 1997.

HUTKINS, R. W. **Microbiology and technology of fermented foods**. Iowa: Blackweel Publishing, 2006.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 11920-1 e ISO 11920-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes***, Suíça, 1996

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Tradução de Eduardo César Tondo, *et al.* 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

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

LEISTNER, L. Microbiologia durante a fermentação e maturação de produtos crus. In: SILVA, R. Z. M. ed. **Aplicação da Biotecnologia em Produtos Cárneos**. Campinas: ITAL, 1990.

LEROY, F.; De VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional *starter* cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 67-78, 2004.

LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; De VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 210-285, 2006.

LEWUS, C. B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p. 1683-1688, 1991.

LÜCKE, F. K. Fermented meat products. **Food Research International**, v. 27, p. 299-307, 1994.

LÜCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v. 56, p. 105-115, 2000.

MACEDO, R. E. F. **Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo fermentado**. Curitiba, 2005. 193 f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná.

MAGRO, G. R.; KLEIN, C.S. Qualidade Microbiológica de Salames tipo Colonial Comercializados na Cidade de Concordia-SC: análise de *Salmonella*, *coliformes totais e termotolerantes*. **Embrapa Suínos e Aves**, Comunicado técnico n°449, 2006.

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, p. 149-158, 2004.

MAYR-HARTING, A., HEDGES, A. J., BERKELEY, R. C. W. Methods for studying bacteriocins. In **Methods in Microbiology**, v. 7a. NORRIS, J. R., RIBBONS, D. W., eds. New York: Academic Press. 1972. p. 313-342.

MCCARTHY, S. A. Incidence and survival of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat sea food products. **Journal of Food Protection**, v.60, n.4, p.372-376, 1997.

MIRALLES, M. C.; FLORES, J.; PEREZ-MARTINEZ, G. Biochemical tests for the selection of Staphylococcus strains as potential meat *starter* cultures. **Food Microbiology**, v. 13, p. 227-236, 1996.

MOORE, J. E. Gastrointestinal outbreaks associated with fermented meats. **Meat Science**, v. 67, p. 565-568, 2004.

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

NASSU, R.T. **Utilização de carne de caprinos no processamento de embutido fermentado, tipo salame**. Campinas, 1999. Tese de Doutorado (Faculdade de Engenharia de Alimentos)- Universidade Estadual de Campinas.

NOTERMANS, S.; DUFRENNE, J.; TEUNIS, P.; CHACKRABORTY, T. Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 2, p.244-248, 1998.

NIGHTINGALE, K. K.; THIPPAREDDI, H.; PHEBUS, R. K.; MARSDEN, J. L.; NUTSCH, A. L. Validation of a traditional Italian-style salami manufacturing process for control of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 4, p.794-800, 2006.

OLIVEIRA, K. A. M; MENDONÇA, R. C. S. Efeito da fermentação sobre a microbiota de embutidos cárneos. **Higiene Alimentar**, v.18, n. 123, 2004.

ORDOÑEZ, J.; RODRÍGUEZ, M. I.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de Alimentos**. Tradução de Fátima Murad. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 2 v.

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

PAPAMANOLI, E.; TZANETAKIS, N.; LITPOULOU-TZANETAKI, E.; KOTZEKIDOU, P.; Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dryfermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science**, v. 65, p. 859-867, 2003.

PARDI, M. C. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 1996. 2 v.

PEARSON, A. M.; GILLETT, T. A. **Processed meats**. 3 ed. New York: Chapman & Hall, 1996. 448 p.

PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 524 p.

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

PRÄNDL, O. **Tecnología e higiene de la carne**. Zaragoza: Acribia, 1994.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **Ciencia de la Carne y de los Productos Carnicos**. Tradução de Juan Luis de la Fuente. Zaragoza: Acribia, 1994. 581p.

RITTER, R.; SANTOS, D.; AGOSTINI, F. S.; CARBONI, A. N.; BERGMANN, G. P. Microbiologia contaminante e patogênica de linguiça (salame) colonial, analisadas em quatro períodos distintos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 113, p. 60-66, 2003.

SAMELIS, J.; MAUROGENAKIS, F.; METAXOPOULOS, J. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 179-196, 1994.

SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; VLASSI, M.; PAPPA, A. Stability and safety of traditional Greek salami – a microbiological ecology study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 69-82, 1998.

SANTOS, E. M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of 'chorizo'. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 123-128, 1998.

SANZ, Y.; FLORES, J.; TOLDRA, F.; FERIA, A. Effect of pre-ripening on microbial and chemical changes in dry fermented sausages. **Food Microbiology**, v. 14, p. 575-582, 1997.

SAWITZKI, M.C.; FIORENTINI, A.M.; CUNHA JUNIOR, A.; BERTOL, T.M.; SANT'ANNA, E.S. *Lactobacillus plantarum* AJ2 isolated from naturally fermented sausage and its effects on the technological properties of Milano-type salami. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p. 709-717, 2008.

SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F-K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p. 1901-1906, 1989.

SCHILLINGER, U.; KAYA, M.; LÜCKE, F-K. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p.473-478.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 58-64, 1996.

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

SEBRANEK, J. G; BACUS, J. N. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? **Meat Science**, v. 77, p. 136-147, 2007.

SHAW, B. G.; HARDING, C. D. A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 56, p. 25-40, 1984.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

TALON, R.; LEROY, S. LEBERT, I. Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: the importance of indigenous *starters*. **Meat Science**, v. 77, p. 55-62, 2007.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. **Bacteriological Reviews**, v.10, p. 722-756, 1976.

TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo: UNISINOS, 1998. 216 p.

TERRA, N. N. ; CICHOSKI, A. J. ; FREITAS, R. J. S. Valores de nitrito e TBARS durante o processamento e armazenamento da paleta suína curada, maturada e fermentada. **Ciência Rural**, v.63, n.3, p. 965-970, 2006.

TERRA, A.; FRIES, L.;TERRA,N. **Particularidades na fabricação do salame**. São Paulo: Varela, 2004.

TERRA, N.; TERRA, A. B.; TERRA, L. M. **Defeitos nos produtos cárneos: origens e soluções**. São Paulo: Varela, 2004.

THÉVENOT, D.; DERNBURG, A.; VERNZOY-ROZAND, C. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p.7-17, 2006.

THÉVENOT, D.; DELINGNETTE-MULLER, M. L; CHRISTIEANS, S.; VERNZOY-ROZAND,C. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 85-94, 2005.

TYÖPPÖNEN, 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, p. 181-185, 2003.

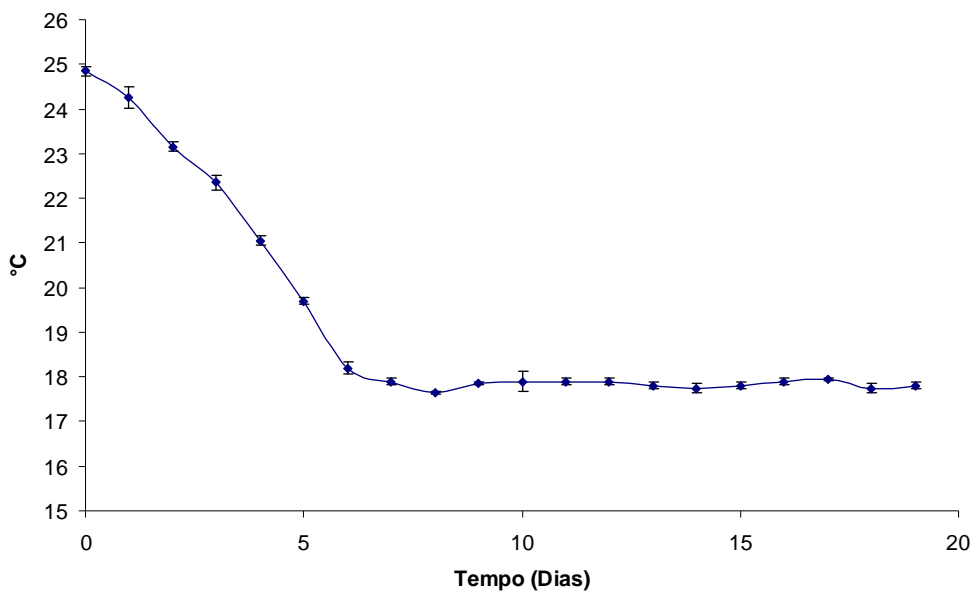
TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 233-244, 2003.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Blackie Academic and Professional, v. 2, 1995.

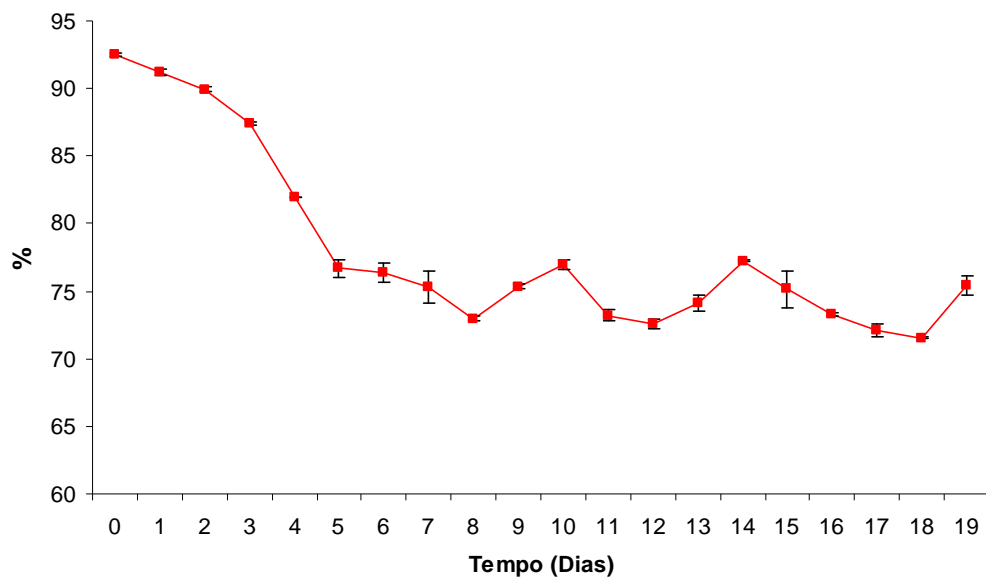
ZHANG, X.; KONG, B.; XIONG, Y. Production of cured meat color in nitrite-free Harbin red sausage by *Lactobacillus fermentum* fermentation. **Meat Science**, v. 77, p. 593-598, 2007.

ANEXO

Comportamento da temperatura da câmara climática durante maturação de linguiça colonial



Comportamento da umidade relativa da câmara climática durante maturação de linguiça colonial



Valores apresentados são a média das três repetições. As barras verticais representam o erro padrão.