



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**ELAINE NÓBREGA GIBSON SILVA**

**EFICÁCIA DO BACTERIÓFAGO P100 E SAIS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NO  
CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO POR *Listeria monocytogenes*  
INOCULADA ARTIFICIALMENTE EM QUEIJOS**

Salvador  
2011

**ELAINE NÓBREGA GIBSON SILVA**

**EFICÁCIA DO BACTERIÓFAGO P100 E SAIS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NO  
CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO POR *Listeria monocytogenes* INOCULADA  
ARTIFICIALMENTE EM QUEIJOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal da Bahia, como requisito final para  
a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Rogéria Comastri de Castro Almeida

Salvador

2011

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Silva, Elaine Nóbrega Gibson.

Eficácia do bacteriófago P100 e sais de ácidos orgânicos no controle da contaminação por *Listeria monocytogenes* inoculada artificialmente em queijos / Elaine Nóbrega Gibson Silva. - 2011.

129 f. : il.

Orientadora: Profª Drª Rogéria Comastri de Castro Almeida.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2011.

1. Alimentos - Microbiologia. 2. *Listeria monocytogenes*. 3. Bacteriófago. 4. Ácidos orgânicos. 5. Queijo-de-minas. I. Almeida, Rogéria Comastri de Castro. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 576.163

CDU - 579.67

Dedico este trabalho aos meus pais, Eliene e Luiz Vicente, pela dedicação e amor incondicional e por serem os maiores responsáveis pelas minhas conquistas,

Ao meus queridos e amáveis irmãos, Luiz e Fábio, pela presença fiel, amizade e paciência; sem eles a vida não teria o mesmo brilho,

Ao meu esposo e querido amigo, Anderson, pela amizade, companheirismo e o amor que o faz acreditar muito mais em mim do que eu mesma.

E Agradeço a Deus, por me dar a vida e sabedoria para seguir em frente.

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Rogéria C. C. Almeida, pela presença, oportunidade, confiança e, fundamentalmente, os conhecimentos repassados fazendo jus ao termo Orientadora,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida,

Aos Professores Celso Duarte e Ryzia de Cássia Vieira Cardoso, pela valorosa contribuição no exame de qualificação,

Às amigas Ana Cláudia Leite e Fernanda Miranda pela ajuda e contribuição no desenvolvimento dos trabalhos no laboratório,

Aos técnicos Luiz e Ayse pela ajuda no laboratório,

A todos os professores, funcionários e colegas do Mestrado pela dedicação e apoio,

Aos meus queridos familiares e amigos pela inestimável confiança e carinho depositados em mim,

Enfim, a todos que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas  
lutamos para que o melhor fosse feito.  
Não somos o que deveríamos ser, não somos o que  
iremos ser...  
Mas, Graças a Deus, não somos o que éramos."

*Martin Luther King*

## RESUMO

Apesar dos recentes avanços nas tecnologias de controle de patógenos em alimentos, os consumidores tem procurado alimentos “naturais”, isto é, submetidos a tratamentos menos agressivos e isentos de conservadores químicos. O emprego de substâncias consideradas GRAS ou “Geralmente Reconhecidas como Seguras” é uma boa alternativa. Dentre estas substâncias, podemos citar os bacteriófagos, que são vírus que infectam bactérias e estão largamente distribuídos do ambiente, e os sais de ácidos orgânicos de cadeia curta. Os queijos são alimentos apontados com frequência, como possíveis veículos de contaminação por *Listeria monocytogenes*, um importante patógeno causador de doença veiculada por alimentos, e sua importância vem aumentando desde a década de 1980. Apesar do número de casos da doença por ano ser relativamente baixo, a infecção pode ser grave com letalidade acima de 30%. Os queijos possuem uma série de condições favoráveis ao desenvolvimento do microrganismo: intensa manipulação no processamento, armazenamento e distribuição; elevada atividade de água, principalmente em queijos de massa macia com média e alta umidade; mistura de diferentes ingredientes; além de serem alimentos mantidos sob refrigeração, o que particularmente favorece a multiplicação de *Listeria monocytogenes*. Em virtude do exposto, o objetivo deste estudo é avaliar a eficácia do bacteriófago P100 e sais de ácidos orgânicos para o controle da contaminação por *Listeria monocytogenes* em queijos de massa macia, do tipo Minas Frescal e Coalho. Determinou-se a contagem de células viáveis de *Listeria monocytogenes*, mistura dos sorotipos 1/2a e 4b, em amostras controle e em amostras submetidas aos tratamentos pelo bacteriófago P100 e sais de ácidos orgânicos nos tempos 0 (zero) e sete dias em armazenamento a 10 °C. Os resultados encontrados demonstram que os tratamentos utilizados foram eficazes para o controle da bactéria no tempo 0 (zero) e após sete dias sob refrigeração, reduzindo por volta de dois ciclos logarítmicos a população microbiana no tempo 0 (zero) em ambos tipos de queijos, o que foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Entretanto, em sete dias de armazenamento observou-se aumento na população do microrganismo (caráter psicrotrófico), sendo obtida uma menor redução decimal (RD), aproximadamente 1 ciclo log, porém com diferença também estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Não se observou diferença estatística entre os tratamentos utilizando os sais de ácidos orgânicos ( $p > 0,05$ ). Este estudo traz uma valiosa contribuição, além de ser pioneiro no Brasil, ao utilizar o bacteriófago P100 e sais de ácidos orgânicos em alimentos típicos brasileiros prontos para o consumo, uma vez que não há relatos na literatura científica nacional sobre a eficácia desses aditivos em queijos.

**Palavras-chave:** *Listeria monocytogenes*, Bacteriófago P100, Sais de ácidos orgânicos, Queijos de massa macia.

## ABSTRACT

Despite recent advances in technologies to control pathogens in foods, consumers have been looking for "natural" foods, i.e., submitted to less aggressive treatments and free of chemical preservatives. The use of substances considered GRAS or "Generally Recognized as Safe" is a good alternative. Among these substances, we can cite the bacteriophages, which are viruses that infect bacteria and are widely distributed environment, and salts of organic acids short chain. The cheeses are foods often pointed as potential vehicles of contamination by *Listeria monocytogenes*, an important pathogen causing disease transmitted by food and its importance has been growing since the 1980s. Although the number of disease cases per year is relatively low, the infection can be serious, with mortality rate at 30%. The cheeses have a number of conditions for the development of microorganism: intense manipulation in processing, storage and distribution; high water activity, especially in soft cheeses with medium and high humidity; mixture of different ingredients; in addition, to food being kept under cooling, which particularly favors the growth of *Listeria monocytogenes*. In view of this, the objective of this study was to evaluate the efficacy of bacteriophage P100 and salts of organic acids to control contamination by *Listeria monocytogenes* in soft cheeses, "Minas Frescal" and "Coalho". The viable cell count of *Listeria monocytogenes*, mix of serotypes 1/2a and 4b, was determined in control samples and samples treated by bacteriophage P100 and organic acids at 0 (zero) and seven days storage at 10 °C. The results show that the treatments were effective for controlling bacteria at time 0 (zero) and after seven days under refrigeration, leading to a reduction of about two logarithm cycles at time 0 (zero) for both types of cheese, which was statistically significant ( $p < 0.05$ ). However, in seven days of storage there was an increase in the population of the microorganism (psychotropic character), resulting in a lower decimal reduction (DR), 1 log cycle approximately, but this reduction was statistically significant ( $p < 0.05$ ) too. There was no difference between the types of organic acids used ( $p > 0.05$ ). This study provides a valuable contribution, and a pioneer in Brazil, by using the bacteriophage P100 and salts of organic acids in typical Brazilian foods ready to eat, since there are no reports in the national scientific literature on the effectiveness of these additives in cheese.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, Bacteriophage P100, Salts of organic acids, Soft cheeses.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1 :	Aspecto morfológico de <i>Listeria monocytogenes</i> – microscopia eletrônica .....	22
Figura 2 :	Ciclo de vida intracelular de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	26
Figura 3 :	Evolução entre 6 horas e 2 dias na formação de biofilme de <i>Listeria monocytogenes</i> em superfície de aço inoxidável .....	36
Figura 4 :	Visão esquemática dos passos que levam à liberação de uma progênie fágica de uma célula infectada.....	59

### CAPÍTULO 2

Figura 1 :	Efeito do bacteriófago P100 no controle de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijo do tipo Minas Frescal no dia zero e após sete dias em armazenamento a 10°C.....	96
Figura 2 :	Efeito do bacteriófago P100 no controle de <i>L. monocytogenes</i> em queijo do tipo Coalho no dia zero e após sete dias em armazenamento a 10°C.....	97

### CAPÍTULO 3

Figura 1 :	Efeito dos tratamentos com ácidos orgânicos no controle de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijo do tipo Minas Frescal, no dia zero e após sete dias em armazenamento a 10°C .....	118
Figura 2 :	Efeito dos tratamentos com ácidos orgânicos no controle de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijo do tipo Coalho, no dia zero e após sete dias em armazenamento a 10°C .....	119

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1 :	Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijos de vários países.....	41
Tabela 2 :	Surtos e casos esporádicos suspeitos e comprovados de listeriose alimentar.....	47

### CAPÍTULO 2

Tabela 1-	População de <i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipos 1/2a e 4b (UFC/ mL), obtida no preparo das suspensões bacterianas.....	93
Tabela 2-	Título (UFP/mL) do Bacteriófago P100 .....	94
Tabela 3-	População de <i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipos 1/2a e 4b, após a inoculação das amostras de queijo tipo Minas Frescal, nos tempos zero e sete dias.....	95
Tabela 4-	População de <i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipos 1/2a e 4b, após a inoculação das amostras de queijo tipo Coalho, nos tempos zero e sete dias.....	95
Tabela 5-	Valores médios das contagens de <i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipos 1/2a e 4b (log de UFC/g), nas amostras de queijo Minas Frescal em função da adição ou não do bacteriófago P100, nos tempos zero e sete dias.....	101
Tabela 6-	Valores médios das contagens de <i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipos 1/2a e 4b (log de UFC/g), nas amostras de queijo do tipo Coalho em função da adição ou não do bacteriófago P100, nos tempos zero e sete dias.....	101

### CAPÍTULO 3

Tabela 1 -	População de <i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipos 1/2a e 4b (UFC/ mL), obtida no preparo das suspensões bacterianas.....	115
Tabela 2 -	População de <i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipos 1/2a e 4b, após a inoculação das amostras de queijo tipo Minas Frescal, nos tempos zero e sete dias.....	116
Tabela 3 -	População de <i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipos 1/2a e 4b, após a inoculação das amostras de queijo tipo Coalho, nos tempos zero e sete dias.....	117
Tabela 4 -	Valores médios das contagens de <i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipos 1/2a e 4b (log de UFC/g), nas amostras de queijo Minas Frescal em função da adição ou não dos tratamentos antimicrobianos, nos tempos zero e sete dias .....	123
Tabela 5 -	Valores médios das contagens de <i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipos 1/2a e 4b (log de UFC/g), nas amostras de queijo tipo Coalho em função da adição ou não dos tratamentos antimicrobianos, nos tempos zero e sete dias .....	123

**LISTA DE QUADROS****CAPÍTULO 1**

Quadro 1 -	Características bioquímicas de <i>Listeria</i> spp.....	25
Quadro 2 -	Distribuição das amostras (%) de <i>Listeria</i> segundo a fonte de isolamento e as origens geográficas.....	39

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	X
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	XI
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>OBJETIVOS</b> .....	19
GERAL .....	19
ESPECÍFICOS .....	19

### CAPÍTULO 1

<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – <i>Listeria monocytogenes</i>: ASPECTOS GERAIS E CONTROLE</b> .....	20
<b>1 HISTÓRICO E IDENTIFICAÇÃO</b> .....	20
<b>2 MICROBIOLOGIA DE <i>Listeria spp.</i></b> .....	22
2.1 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS .....	24
<b>3 LISTERIOSE</b> .....	26
3.1 MECANISMOS DE INFECÇÃO DA <i>Listeria monocytogenes</i> .....	26
3.2 PATOGENIA .....	28
3.2.1 Listeriose nos Animais .....	28
3.2.2 Listeriose em Humanos .....	28
3.3 FORMAS DE TRANSMISSÃO .....	29
3.4 DIAGNÓSTICO .....	30
3.4.1 Métodos de Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> em Alimentos .....	30
3.4.2 Análise Clínica .....	33
3.5 TRATAMENTO E PROFILAXIA .....	33
<b>4 EPIDEMIOLOGIA</b> .....	34
4.1 OCORRÊNCIA DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM ALIMENTOS .....	38
4.2 OCORRÊNCIA DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM QUEIJOS .....	40
4.3 PRINCIPAIS SURTOS ENVOLVENDO <i>Listeria monocytogenes</i> .....	43
<b>5 LEGISLAÇÃO</b> .....	48

<b>6 ANTIMICROBIANOS NATURAIS</b> .....	49
6.1 BACTERIÓFAGOS .....	50
6.1.1 Fatores que Interferem no Biocontrole Realizado por Bacteriófagos .....	53
6.1.2 Estabilidade dos Bacteriófagos nas Instalações de Processamento e em Alimentos .....	55
6.1.3 Uso do Bacteriófago P100 para Controle de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	57
6.2 ÁCIDOS ORGÂNICOS DE CADEIA CURTA E SEUS SAIS .....	60
6.2.1 Mecanismos da Ação Antimicrobiana dos Ácidos Orgânicos .....	60
6.2.2 Uso de Ácidos Orgânicos e Seus Sais em Alimentos .....	63
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67

## CAPÍTULO 2

<b>EFICÁCIA DO BACTERIÓFAGO P100 NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO POR <i>Listeria monocytogenes</i> INOCULADA ARTIFICIALMENTE EM QUEIJOS DE MASSA MACIA</b> .....	83
<b>RESUMO</b> .....	83
<b>ABSTRACT</b> .....	84
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	85
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	86
2.1 MATERIAIS .....	86
2.1.1 Microrganismos de Referência .....	86
2.1.2 Alimentos .....	87
2.1.3 Tratamento Antimicrobiano .....	87
2.2 MÉTODOS .....	88
2.2.1 Local do Estudo .....	88
2.2.2 Desenho do Estudo .....	88
2.2.3 Amostragem e Tratamento das Amostras .....	88
2.2.4 Preparo da Suspensão Bacteriana de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	88
2.2.5 Determinação do Título do Bacteriófago P100 .....	89
2.2.6 Ensaio para Avaliar a Eficácia do Bacteriófago P100 .....	90
2.2.7 Análise Estatística .....	92
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	93
3.1 OBTENÇÃO DO INÓCULO DE <i>Listeria monocytogenes</i> E DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DO BACTERIÓFAGO P100 .....	93
3.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO BACTERIÓFAGO P100 SOBRE CÉLULAS DE <i>Listeria monocytogenes</i> INOCULADAS EM AMOSTRAS DE QUEIJOS DE MASSA MACIA .....	94
3.2.1 Amostras de Queijo Controle para Células de <i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipos 1/2a e 4b .....	94
3.2.2 Tratamento das Amostras de Queijos Inoculadas Artificialmente com <i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipos 1/2a e 4b, com o Bacteriófago P100 .....	96
3.3. Análise Estatística .....	100
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	102
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	103

### CAPÍTULO 3

<b>EFICÁCIA DE SAIS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DE CADEIA CURTA NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO POR <i>Listeria monocytogenes</i> INOCULADA ARTIFICIALMENTE EM QUEIJOS DE MASSA MACIA .....</b>	<b>106</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>106</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>107</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>108</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>109</b>
2.1 MATERIAL .....	109
2.1.1 Microrganismos de Referência .....	109
2.1.2 Alimentos .....	109
2.1.3 Tratamentos com Antimicrobianos .....	110
2.2 MÉTODOS .....	110
2.2.1 Local do Estudo .....	110
2.2.2 Desenho do Estudo .....	111
2.2.3 Amostragem e Tratamento das Amostras .....	111
2.2.4 Preparo da Suspensão Bacteriana de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	111
2.2.5 Ensaio para Avaliar a Eficácia dos Sais de Ácidos Orgânicos de Cadeia Curta.....	112
2.2.6 Análise Estatística .....	114
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>115</b>
3.1 OBTENÇÃO DO INÓCULO DE <i>Listeria monocytogenes</i> sorotipos 1/2a e 4b .....	115
3.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS SAIS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DE CADEIA CURTA SOBRE CÉLULAS DE <i>Listeria monocytogenes</i> INOCULADAS EM AMOSTRAS DE QUEIJOS .....	116
3.2.1 Amostras de Queijo Controle para Células de <i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipos 1/2a e 4b .....	116
3.2.2 Tratamento das Amostras de Queijos Inoculadas Artificialmente com <i>Listeria monocytogenes</i> , sorotipos 1/2a e 4b, com Sais de Ácidos Orgânicos de Cadeia Curta .....	117
3.3 Análise Estatística .....	122
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>124</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>126</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>129</b>

## INTRODUÇÃO

O advento da tecnologia propiciou o desenvolvimento de diferentes técnicas para garantir a qualidade e inocuidade dos produtos alimentícios. Entretanto, as Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) continuam sendo um problema para a Saúde Pública o que aponta a necessidade de métodos mais eficazes para o combate de microrganismos patogênicos.

Dentre os patógenos mais perigosos destaca-se a *Listeria monocytogenes*, devido a sua capacidade de sobreviver e proliferar em alimentos mantidos sob temperaturas de refrigeração e à alta letalidade da doença resultante.

A ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* é particularmente perigosa para gestantes e pessoas com o sistema imunológico comprometido, como portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida, hepatopatias, doença renal, carcinoma e outras doenças. Idosos e recém-nascidos também são considerados como indivíduos de alto risco. Contudo, a doença pode ocasionalmente ocorrer em indivíduos não predispostos.

Os alimentos mais envolvidos em surtos de listeriose são o leite cru e pasteurizado, queijos, carnes bovina, suína, de aves e derivados, frutos do mar, além de produtos de origem vegetal, crus ou processados, e refeições preparadas.

Os queijos são alimentos apontados com freqüência, como possíveis veículos de contaminação por *L. monocytogenes*. Estes alimentos possuem uma série de condições favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos, a saber: produção muitas vezes artesanal, o que retrata a intensa manipulação no processamento, armazenamento e distribuição; a elevada atividade de água, principalmente em queijos de massa macia com média e alta umidade; mistura de diferentes ingredientes; além de serem alimentos mantidos sob refrigeração, o que favorece, particularmente, a multiplicação da *L. monocytogenes*.

Mesmo que a matéria prima possa se apresentar livre do patógeno e de se aplicar rigorosos procedimentos de limpeza e sanitização no ambiente de processamento das indústrias, os alimentos processados tem sido contaminados

por *L. monocytogenes*. Esta bactéria pode se aderir a vários tipos de superfícies sendo encontrada em biofilmes nos ambientes de processamento de carnes e produtos de laticínios, e é possível que algumas linhagens possam ter adquirido resistência aos sanitizantes comumente usados pelas indústrias. Assim, a resistência natural de *L. monocytogenes* a muitos dos sistemas de preservação de alimentos, que são efetivos contra outros patógenos responsáveis por toxinfecções alimentares, tem despertado a atenção e incentivado as pesquisas para o desenvolvimento de sistemas mais efetivos para o controle da bactéria.

Apesar dos recentes avanços nas tecnologias de controle de patógenos em alimentos, os consumidores tem procurado alimentos “naturais”, isto é, submetidos a tratamentos menos agressivos e isentos de conservadores químicos. Dessa forma, o emprego de substâncias consideradas GRAS ou “Geralmente Reconhecidas como Seguras” é uma alternativa que vem sendo recomendada por vários pesquisadores.

Dentre estas substâncias podemos citar os bacteriófagos que são vírus que infectam somente bactérias e não infectam células animais ou vegetais. Estão largamente distribuídos no ambiente, e o homem está exposto a eles em altas concentrações através da água e dos alimentos sem qualquer efeito adverso. São parasitos intracelulares obrigatórios, que utilizam as bactérias para sua multiplicação, sendo portanto, componentes da microbiota natural da produção de alimentos, desde a produção até a comercialização do produto final.

Em 2007, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e a agência norte-americana Food and Drug Administration (FDA) aprovaram o uso do LISTEX™ P100, uma solução antimicrobiana composta de seis bacteriófagos específicos para o controle de *Listeria monocytogenes* em alimentos. Esse composto se mostrou efetivo para 170 estirpes do patógeno e permitiu que a resistência adquirida pelo microrganismo fosse minimizada.

Estratégias antimicrobianas para superar a tolerância do patógeno a baixas temperaturas são essenciais e o uso de ácidos orgânicos de cadeia curta pode ser promissor em combinação ou não com outros tratamentos. A atividade antimicrobiana dos sais de sódio e de outros ácidos orgânicos de cadeia curta, como o ácido cítrico, ácido acético e combinações do seus sais tem sido relatada

e todas essas substâncias são geralmente reconhecidas como seguras “GRAS” pelo Código Federal de Regulamentações dos Estados Unidos.

Sais de ácidos orgânicos tais como lactato de sódio ou lactato de potássio e diacetato de sódio são usados extensivamente na indústria de carne e de aves para alcançar os benefícios antimicrobianos. Entretanto, estudos publicados sobre atividade antimicrobiana dessas substâncias sobre *L. monocytogenes* em queijos são limitados.

O desenvolvimento deste estudo traz uma contribuição sobre a eficácia do uso do bacteriófago P100 e sais de ácidos orgânicos para o controle da contaminação por *L. monocytogenes* em queijos de massa macia. Assim, o uso destes antimicrobianos naturais poderá contribuir para o aumento da segurança microbiológica de queijos, produtos largamente consumidos no Brasil.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia de bacteriófago e sais de ácidos orgânicos de cadeia curta sobre cepas de *Listeria monocytogenes* inoculadas artificialmente em queijos de massa macia.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a eficácia do bacteriófago P100 sobre células de *Listeria monocytogenes* inoculadas artificialmente em queijos de massa macia dos tipos Minas Frescal e Coalho;

b) Avaliar a eficácia dos sais de ácidos orgânicos: acetato de sódio, propionato de sódio e lactato de sódio, sobre células de *Listeria monocytogenes* inoculadas artificialmente em queijos de massa macia dos tipos Minas Frescal e Coalho;

c) Verificar se existem diferenças entre os tratamentos sobre os alimentos imediatamente após a inoculação da bactéria e após sete dias sob refrigeração;

d) Verificar se existem diferenças entre os tratamentos, comparando os diferentes tipos de queijos.

## CAPÍTULO 1

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### *Listeria monocytogenes*: ASPECTOS GERAIS E CONTROLE

##### 1 HISTÓRICO E IDENTIFICAÇÃO

O histórico de *Listeria monocytogenes* e listeriose registra-se desde o século XIX. Em 1889, Pfeiffer relatou uma doença em seres humanos de causa desconhecida, possivelmente a listeriose. Porém, somente em 1919, na Suécia, é que o agente da doença foi isolado a partir de fígado de coelho, por Hillers (CORRÊA; CORRÊA, 1992). A primeira descrição do microrganismo foi feita por Murray et al. em 1926. Eles descreveram uma infecção espontânea que ocorreu entre os coelhos e cobaias de laboratório no biotério da Universidade de Cambridge, no Reino Unido, e denominaram o agente de *Bacterium monocytogenes*, em virtude de a infecção ser caracterizada por uma monocitose (SALAMANO et al., 2005). No ano seguinte, em 1927, Pirie estudando uma epizootia em roedores na África do Sul, isolou do fígado dos animais uma bactéria que recebeu a denominação de *Listerella hepatolytica*, em homenagem ao cientista e cirurgião britânico lorde Joseph Lister (1827-1912), que estudou infecção séptica pós-operatória. Contudo, considerando ser parecido com o agente isolado pelos autores ingleses e como já existia um gênero vegetal chamado *Listerella*, finalmente, em 1940, o microrganismo foi denominado de forma definitiva como *Listeria monocytogenes* (HOFER; REIS, 2005).

Os primeiros isolamentos confirmados do microrganismo em indivíduos infectados datam de 1929 por Nyfeldt. E, com o passar do tempo, casos esporádicos e pontuais de listeriose foram identificados, os quais estavam associados a indivíduos que tiveram contato com animais doentes, caracterizando-a como uma doença ocupacional. Na década de 1980, devido ao relato de diversos surtos decorrentes da ingestão de alimentos contaminados, o

interesse pela bactéria aumentou rapidamente entre as indústrias, agências reguladoras e pesquisadores (FARBER; PETERKIN, 1991).

O gênero *Listeria* está relacionado filogeneticamente aos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Brochotrix*. Atualmente, esse grupo compreende seis espécies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* (subespécies *ivanovii* e *landoniensis*), *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* e *Listeria grayi*, porém somente duas espécies são reconhecidamente patogênicas, enquanto a *L. ivanovii* apresenta patogenicidade restrita aos ruminantes, a *L. monocytogenes* pode infectar uma variedade de espécies animais, incluindo o homem (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

As seis espécies citadas podem ser divididas em dois grupos: hemolíticas e não hemolíticas. No primeiro grupo estão: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* (subespécies *ivanovii* e *landoniensis*) e *L. seeligeri*. As não hemolíticas (segundo grupo) são *L. grayi*, *L. innocua* e *L. welshimeri* (BILLE; ROCOURT; SWAMINATHAN, 2003).

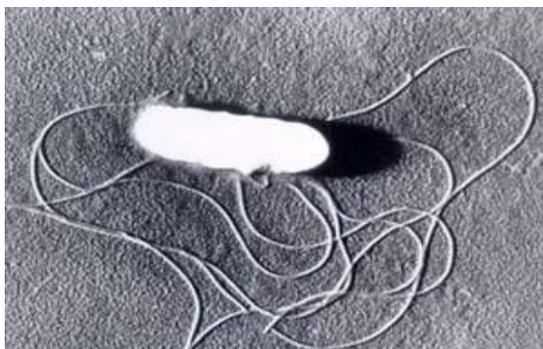
De acordo com Jay (2005), a *L. monocytogenes* está representada por treze sorovares, alguns dos quais são compartilhados por *L. innocua* e por *L. seeligeri*. Embora *L. innocua* esteja representada somente por três sorovares, muitas vezes ela é considerada uma variante não patogênica de *L. monocytogenes*. A grande heterogeneidade antigênica desta última espécie pode estar relacionada com o grande número de hospedeiros animais nos quais é capaz de se multiplicar.

Anteriormente, a especificidade antigênica de *L. monocytogenes* correspondia a apenas dois tipos sorológicos (1 e 4), estando um deles associado a roedores e o outro a ruminantes, e ambos, ao homem. Posteriormente, com base em análises antigênicas mais detalhadas, demonstrou-se a existência de antígenos somáticos termoestáveis ("O") e flagelares termolábeis ("H") contendo carboidratos em sua composição, tendo-se assim quatro tipos sorológicos principais (1, 2, 3 e 4) e a subdivisão em subtipos (SEELIGER; LANGER, 1989). A caracterização antigênica que define sorovares é um sistema de tipagem que não apresenta uma capacidade discriminatória mais ampla, tendo em vista a incidência e/ou prevalência de um número limitado de sorotipos nas diferentes fontes de infecção e vias de transmissão. Assim, treze sorotipos são identificados

de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7). Porém, apenas três (1/2a, 1/2b e 4b) estão relacionados a casos de listeriose humana (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

## 2 MICROBIOLOGIA DE *Listeria* spp.

As bactérias do gênero *Listeria* possuem forma de bastonete curto, com diâmetro de 0,4 a 0,5  $\mu\text{m}$  e comprimento de 0,51 a 2,0  $\mu\text{m}$ ; são Gram positivas e possuem flagelos peritríquios, os quais dão motilidade ao microrganismo. São desprovidas de cápsula, não formadoras de esporos e multiplicam-se tanto em aerobiose como em anaerobiose, com preferência a ambientes microaerofílicos. Por causa desta característica, elas também podem se desenvolver em atmosferas modificadas (LOGUERCIO et al., 2001) (FIGURA 1).



**Fonte:** University of Wisconsin-Madison. Department of Bacteriology. Kenneth Todar (2009).

**FIGURA 1:** Aspecto morfológico de *Listeria monocytogenes* – microscopia eletrônica.

O microrganismo requer nutrientes específicos para seu crescimento, como os aminoácidos cisteína, glutamina, isoleucina e valina além das vitaminas

biotina, riboflavina e tiamina. Em ágar nutriente, as colônias típicas de *Listeria* são cinza-azuladas, apresentando de 0,2 a 0,8  $\mu\text{m}$  de diâmetro após incubação (DONNELLY, 2001). Quando visualizadas à luz transmitida em direção oblíqua, as colônias apresentam brilho azul-esverdeado (JAY, 1996; ROCOURT, 1999).

Muitos fatores podem ser apontados como determinantes para o crescimento, multiplicação e sobrevivência de *Listeria* em alimentos, dentre eles: pH, temperatura, atividade de água, concentração salina, nitrito de sódio, conservantes e atmosfera (KASNOWSKI, 2004). Assim, demonstra ser um microrganismo que revela particularidades em relação a capacidade e resistência de multiplicação que a torna ainda mais perigosa à saúde, devido à capacidade de crescer em diferentes temperaturas, tempos de incubação e concentrações salinas. É capaz de crescer em temperaturas que variam de 3 a 45 °C, apresentando uma faixa ótima entre 30 e 37 °C; e resiste a sucessivos congelamentos e descongelamentos. É também resistente a uma ampla faixa de pH, 4,4 a 9,6, com pH ótimo de crescimento de 7,0 (LOGUERCIO et al., 2001).

A bactéria pode tolerar concentrações de 10% a 30% de cloreto de sódio e crescer a uma atividade de água de 0,90, dependendo de fatores que influenciam a multiplicação, como pH e temperatura (LOVETT, 1989). Foi demonstrado que *L. monocytogenes* em ambientes com 25,5% de NaCl sobrevive por 132 dias a 4 °C, 32 dias a 22 °C e cinco dias a 37 °C (SEELIGER; JONES, 1986). Também foi constatada a sobrevivência desse microrganismo em ambientes desidratados, indicando sua capacidade de tolerar atividade de água inferior a 0,93 (DOYLE; MESKE; MARTH, 1985).

As exigências nutricionais para o crescimento de *Listeria* são praticamente as mesmas das outras bactérias Gram positivas, crescendo bem em meios comuns como o caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e ágar tripticase de soja (TSA). Apesar da maioria das descrições terem sido baseadas em *L. monocytogenes*, as exigências para as outras espécies parecem ser as mesmas (JAY, 2000).

## 2.1 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

As bactérias do gênero *Listeria* apresentam reação positiva para catalase e negativa para oxidase; apresentam teste vermelho de metila positivo; produzem amônia a partir de arginina; além disso, podem crescer na presença de 10% ou até 40% de bile e possuem a capacidade de hidrolisar esculina, salicina, amigdalina e hipurato de sódio; reagem negativamente para produção de sulfeto de hidrogênio, indol e nitrato redutase; hidrolisam amido e uréia; reduzem telurito, e são parcialmente inibidas por 0,02% de azida e cianida (JAY, 1996).

Os substratos primários para o desenvolvimento das espécies de *Listeria* são a glicose (fonte de carbono) e a glutamina (fonte de nitrogênio), sendo a multiplicação estimulada por  $\text{Fe}^{3+}$  e fenilalanina. A utilização de glicose em condições aeróbias resulta na produção de acetato, lactato e acetoína como produtos finais (ROCOURT, 1999).

A fermentação de açúcares como D-glucose, D-xilose, D-manitol e L-rhamnose e a reação de hemólise são as principais ferramentas para a diferenciação bioquímica entre as espécies de *Listeria*. A *L. monocytogenes* apresenta reação de hemólise quando semeada em agar sangue ovino ou eqüino formando uma estreita zona de hemólise ao redor da colônia, enquanto *L. ivanovii* forma uma acentuada zona de hemólise. *L. seeligeri* pode ou não apresentar reação de hemólise fraca, e as outras espécies não são hemolíticas (SEELIGER; JONES, 1986).

O teste Christie-Atkins-Munch-Peterson (teste de CAMP) é utilizado para diferenciar as espécies hemolíticas e a *L. innocua*, já que essas espécies apresentam reações bioquímicas similares. O teste de CAMP detecta reações sinérgicas de hemolisinas de *Listeria* spp. com a beta toxina de *Staphylococcus aureus* e com exofator de *Rhodococcus equi*. *L. monocytogenes* apresenta reação positiva com *S. aureus*, mas negativa com *R. equi*; *L. ivanovii* apresenta reação inversa e *L. innocua* apresenta reação negativa ao teste de CAMP (McKELLAR, 1994) (QUADRO1).

**QUADRO 1.** Características bioquímicas de *Listeria* spp.

Características	Espécies					
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Listeria grayi</i>
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-
Crescimento em presença de bile e hidrólise da esculina	+	+	+	+	+	+
β-hemólise em ágar sangue	+	++	-	-	(+)	-
Redução do nitrato a nitrito	-	-	-	-	-	-
Teste de CAMP com <i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	(+)	-
Teste de CAMP com <i>Rhodococcus equi</i>	-	+	-	-	-	-
Produção de ácido a partir de:						
D - manitol	-	-	-	-	-	+
L - rhamnose	+	-	V	V	-	-
D - xilose	-	+	-	+	+	-
α-metil D-manosídeo	+	-	+	+	V	NE

+ = reação positiva

++ = reação positiva forte

(+) = reação positiva fraca

(-) = reação negativa

NE = não estabelecido

V = variável

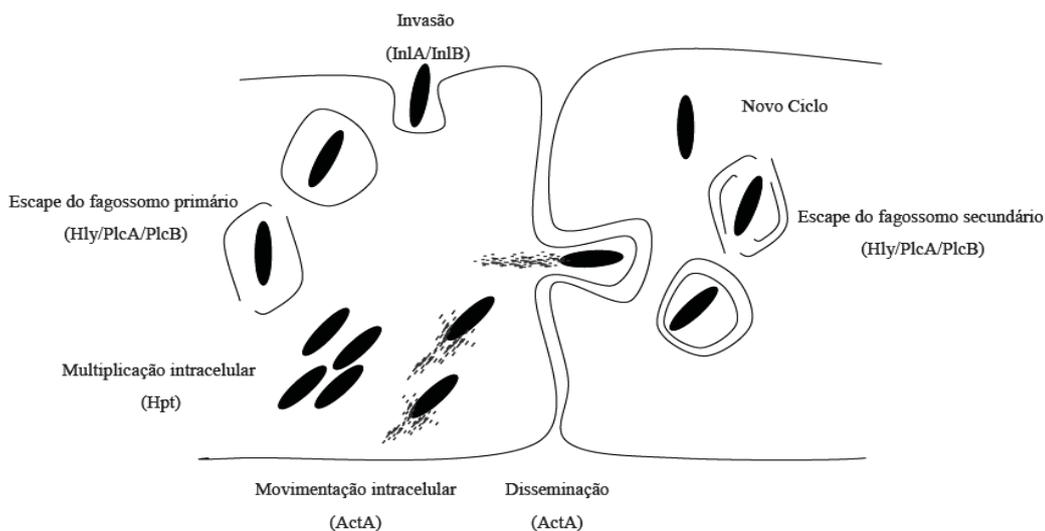
**Fonte:** Adaptação de Franco e Landgraf (2005)

### 3 LISTERIOSE

#### 3.1 MECANISMOS DE INFECÇÃO DA *Listeria monocytogenes*

O mecanismo que envolve a invasão da *L. monocytogenes* nas células do homem é bastante singular. Ela tem a capacidade de invadir macrófagos e uma série de células não fagocíticas de diferentes órgãos e tecidos, como as dos hepatócitos e endoteliais. A estratégia de invasão célula a célula permite a sua proliferação dentro dos tecidos hospedeiros e a formação de focos infecciosos, protegendo-se das defesas do hospedeiro, como os anticorpos circulantes. Este pode ser o motivo pelo qual os anticorpos não exercem um papel importante na recuperação a partir de uma infecção, ou proteção contra infecções secundárias (CABANES et al., 2002).

A *L. monocytogenes* desenvolve um ciclo celular parecido em todas as células eucarióticas, dividido em três etapas: escape do fagossomo após a fagocitose, multiplicação na célula hospedeira e invasão da célula vizinha. A invasão é decorrente da polimerização de filamentos de actina que impulsionam a bactéria em direção à célula adjacente, provocando a formação de invaginações e fagocitose, começando assim, um novo ciclo (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001) (FIGURA 2).



**FIGURA 2:** Ciclo de vida intracelular de *Listeria monocytogenes*. As proteínas responsáveis por cada etapa aparecem entre parênteses.

Fonte: Tilney e Portnoy (1989)

A internalização da *L. monocytogenes* se dá através da superfície basolateral de células epiteliais intestinais (JONQUIERES, 1999); porém, também pode colonizar as placas de Peyer, pela invasão nas células M, como demonstrado em experimentos *in vivo* com camundongos (THERIOT, 1992). Caso consiga resistir aos mecanismos de defesa do trato gastrointestinal, inicia-se a translocação da *L. monocytogenes*, levando à invasão do epitélio intestinal e à colonização de tecidos mais profundos, com posterior disseminação via corrente sanguínea ou linfonodos em direção a órgãos alvos, como fígado e baço (SHEEHAN, 1994).

Assim, o ciclo de infecção da *L. monocytogenes* inicia-se com a adesão da bactéria à superfície da célula eucariótica e posterior entrada na mesma através de fagocitose ou, no caso de células não-fagocíticas, pela interação entre moléculas ligantes presentes na superfície da bactéria e receptores da superfície da célula eucariótica. A invasão ocorre por um mecanismo conhecido como “zíper” no qual a bactéria progressivamente vai penetrando na célula até que seja totalmente internalizada (GAILLARD et al., 1991; IRETON; COSSART, 1998). Durante este processo, a membrana da célula eucariótica vai envolvendo a bactéria, levando a pequenas mudanças no citoesqueleto do hospedeiro.

Após a invasão, a bactéria se encontra em um fagossomo que se acidifica rapidamente (BEAUREGARD et al., 1997). Há evidências que *L. monocytogenes* impeça a fusão do fagossomo com lisossomo para poder estabelecer seu ciclo de infecção, evitando desta maneira a ação de enzimas que poderiam levar à sua destruição (RYSER; MARTH, 2006). Após meia hora de invasão, a bactéria inicia o processo de ruptura da membrana fagossômica, sendo que em 2 horas 50% da população bacteriana encontra-se livre no citoplasma. Uma vez dentro do citoplasma, as bactérias se multiplicam com um tempo de geração de aproximadamente 1 hora. Esta etapa, essencial para a sobrevivência e proliferação do microrganismo, é mediada por uma hemolisina (Hly) juntamente com fosfolipases (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

As bactérias intracitoplasmáticas, após escaparem do fagossomo, são imediatamente envolvidas por uma camada de monômeros de actina, que posteriormente são reorganizados em um dos pólos do microrganismo. Esta reorganização é codificada por um único gene, *actA*, responsável pelo movimento

inter e intracelular da bactéria. Este rearranjo propicia a movimentação de *L. monocytogenes* pelo citoplasma na velocidade de 0,3  $\mu\text{m/s}$  (DRAMSI; COSSART, 1998).

A movimentação da *L. monocytogenes* é aleatória e, em um determinado momento, a bactéria consegue alcançar o limite da periferia celular. E, quando em contato com a membrana celular, é empurrada para o exterior dando lugar a uma protrusão. Esta estrutura penetra na célula vizinha resultando na formação de um vacúolo de dupla membrana - fagossomo de dupla membrana (COSSART, 1995).

Após a formação do vacúolo de dupla membrana (cerca de 5 minutos), a bactéria escapa para o citoplasma, onde começa um novo ciclo de proliferação intracelular e de passagem célula-célula (THERIOT, 1992).

## 3.2 PATOGENIA

### 3.2.1 Listeriose nos Animais

Têm sido relatadas infecções causadas por *L. monocytogenes* em mais de 40 espécies de animais silvestres e domésticos. A infecção por *L. ivanovii* geralmente tem sido associada a abortos esporádicos. Em ruminantes, a listeriose está associada à ingestão de silagem contaminada, e pode se apresentar como encefalite, aborto, septicemia ou endoftalmite e geralmente, apenas uma forma da doença ocorre em determinado grupo de animais afetados. Na forma subclínica, há relatos de casos raros de mastite listerial em bovinos (GITTER; BRADLEY; BLAMPIED, 1980; JENSEN et al., 1996). Em animais recém-nascidos freqüentemente observa-se septicemia. Em cães, gatos, eqüinos e suínos a listeriose pode provocar abortos além de encefalite (QUINN, 2005).

### 3.2.2 Listeriose em Humanos

A importância da listeriose em humanos está mais associada à mortalidade, cerca de 25-30% superior a taxa de morbidade (VÁZQUEZ-BOLAND

et al., 2001). A doença pode se manifestar de duas formas: invasiva e não invasiva.

A forma invasiva da listeriose é caracterizada por se manifestar mais severamente em pessoas pertencentes aos grupos de risco. No caso de gestantes, a infecção é mais freqüente no terceiro trimestre, geralmente assintomática ou com sintomas parecidos com os da gripe; porém, para o feto ou recém nascido as conseqüências são muito mais graves, incluindo parto prematuro, aborto, morte fetal, meningite e septicemia (ROCCOURT; COSSART, 1997; CRESPO et al., 1999; Di MAIO, 2000; COLODNER et al., 2003) e hidrocefalia (LACIAR et al., 2000).

Em adultos, *L. monocytogenes* apresenta tropismo pelo sistema nervoso central, causando meningite e meningoencefalite. Em pacientes imunossuprimidos, a bacteremia é mais freqüente e pode ser precedida por infecções focais como osteomielite, pneumonias, endocardites, hepatite e peritonite além de outras patologias (KERR, 1988; CRESPO et al., 1999; HOFER, 2001).

Já a forma não invasiva pode causar uma gastroenterite febril caracterizada por febre, diarréia, cefaléia e dor muscular em indivíduos imunodeprimidos, com um período de incubação que pode variar de 11 horas a 1 semana. Porém, em alguns casos, a doença pode assemelhar-se a uma gripe devido à ausência de sintomas gastrintestinais. Surtos de listeriose não invasiva têm sido mais associados a alimentos prontos para o consumo (SIM et al., 2002).

### 3.3 FORMAS DE TRANSMISSÃO

#### *Origem não alimentar:*

Uma via de transmissão da listeriose é pelo contato direto com animais infectados, porém é considerada rara. Nesta forma de doença surgem lesões cutâneas, especialmente sobre os braços de pessoas que manipulam animais, como médicos veterinários e magarefes. McLauchlin (1996) relata a ocorrência de dezessete casos na literatura mundial.

Outra forma de transmissão é por contaminação cruzada durante o período neonatal, com casos de infecção hospitalar descritos (HOF; LAMPIDIS,

2001; COLODNER et al., 2003). Na maioria dos episódios relatados, as salas de parto, as enfermarias, os equipamentos e a equipe médica envolvida foram relacionados aos casos de listeriose como fontes de infecção (SCHUCHAT; SWAMINATHAN; BROOME, 1991; McLAUHLIN, 1996).

#### *Origem alimentar:*

A principal forma de transmissão da listeriose é o consumo de alimentos contaminados (WHO Working Group, 1988). Uma diversidade de alimentos de origem vegetal e animal têm sido relacionados a casos esporádicos de listeriose no mundo. Além disso, a *L. monocytogenes* é capaz de crescer e sobreviver tanto em alimentos crus, quanto em alimentos processados (McLAUHLIN; GILBERT, 1990).

### 3.4 DIAGNÓSTICO

#### 3.4.1 Métodos de Detecção de *Listeria monocytogenes* em Alimentos

Os métodos de detecção de *Listeria* spp. em alimentos utilizam principalmente a sua capacidade de crescer em baixas temperaturas e a resistência a vários antibióticos como características seletivas de isolamento. A técnica de enriquecimento a frio em meios não-seletivos ainda é considerada a mais segura para o sucesso das análises; contudo, em razão do longo tempo de refrigeração requerido, tem sido substituída pelo enriquecimento em meios seletivos. Esses meios geralmente são caldos nutritivos suplementados com vários agentes antimicrobianos, sendo os mais utilizados o ácido nalidíxico, a acriflavina e a cicloeximida (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007).

Segundo Pereira e Rocourt (1993), desde 1960 os métodos para a pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos e outros substratos vêm utilizando agentes seletivos para inibição da microbiota acompanhante, em especial *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Lactobacillus*, havendo variações diversas no tocante às suas dosagens e associações. Algumas substâncias são recomendadas para o isolamento de *Listeria* spp. em culturas mistas, como telurito de potássio, fenil etanol, cloreto de lítio e tiocinato de potássio.

A acriflavina em combinação com outros agentes seletivos como tiocianato de potássio e polimixina B interrompe a síntese de RNA e mitocôndriogênese inibindo o crescimento de microrganismos Gram positivos. O ácido nalidíxico inibe a síntese de DNA e o crescimento de microrganismos Gram negativos, incluindo *Proteus*; a ciclohexamida (actidiona) inibe a síntese protéica em células eucarióticas e previne o crescimento de bolores e leveduras. Por outro lado, o moxalactam possui largo espectro de ação contra microrganismos Gram-positivos e negativos, incluindo *S. aureus*, *Proteus* e *Pseudomonas* (SLADE, 1992; BEUMER; HAZELEGER, 2003).

As metodologias oficiais para análise microbiológica utilizadas para detecção de *L. monocytogenes* em alimentos, são preconizadas pela Food and Drug Administration (FDA) e pelo United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS, 2005), que são agências federais regulamentadoras para alimentos. O USDA-FSIS é o órgão responsável pela regulamentação de carnes, produtos cárneos, aves e ovos. A FDA é responsável pelos outros alimentos, incluindo pescado. Ambas as agências desenvolvem metodologias e estratégias de controle da qualidade em alimentos, que são adotadas em diversos países.

No método do FDA é utilizado o Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB) a 30 °C/24 e 48h, acompanhado da semeadura na superfície do ágar Oxford (OXA) a 35 °C/24 a 48h e ágar Cloreto de Feniletanol Moxalactam (LPM) a 35 °C/24 a 48h. O método da USDA utiliza enriquecimento secundário em Caldo Fraser a 35 °C/24 a 48h e semeadura de superfície no ágar Oxford Modificado (MOX) a 35 °C/24 a 48h (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007).

Na fase de plaqueamento seletivo em meio sólido, não há diferenciação entre as espécies, devendo-se selecionar cinco colônias para confirmação e identificação das espécies, e essa seleção pode resultar na detecção apenas das espécies não patogênicas, especialmente *L. innocua* que ocorre em maior frequência, em detrimento da espécie patogênica em questão, *L. monocytogenes* (BEUMER; HAZELEGER, 2003). Esses autores sugerem o uso de meios de plaqueamento cromogênicos e de meios à base de sangue para diferenciação das espécies hemolíticas.

Para identificação das espécies se realiza uma série de testes bioquímicos baseados nas características do gênero (Quadro 1), além da verificação de reação de hemólise, motilidade a 25 °C, coloração de Gram e catalase. Como alternativa, apresentando maior praticidade na execução e rapidez nos resultados, podem ser utilizados *kits* comerciais como o sistema miniaturizado de identificação bioquímica API *Listeria* (bioMérieux) (HOFER; REIS, 2005).

Tendo em vista as dificuldades e morosidade encontradas para o isolamento de *L. monocytogenes* por semeadura em meio sólido em placa, diversos autores têm trabalhado no desenvolvimento de técnicas mais rápidas e precisas, que envolvem sempre uma ou mais etapas de enriquecimento e meios de cultura seletivos (DENDER, 1988).

Vários métodos alternativos para detecção rápida de células de *Listeria* têm sido desenvolvidos, os quais são baseados na hibridização de ácidos nucléicos (EMOND; FLISS; PANDIAN, 1993), amplificação de ácidos nucléicos (STARBUCK; HILL; STEWART, 1992) ou uso de anticorpos específicos (RIJPENS et al., 1995). No entanto, eles nem sempre são apropriados para uso na indústria de alimentos. Até o momento nenhuma técnica empregando DNA tem poder discriminatório, capaz de em um único teste reconhecer todas as espécies de *Listeria* (RIJPENS et al., 1995). Além disso, os testes baseados na análise de DNA podem detectar células mortas, porventura presentes nos alimentos (ALMEIDA; ALMEIDA; RODRICK, 1999).

Existe também um método rápido para detectar a presença do indicador *Listeria* spp, chamado placa de Petrifilm™EL. Este é um meio de cultura pronto para uso, que contém agentes seletivos, nutrientes, agente geleificante solúvel em água fria e um indicador cromogênico, que facilita a detecção das espécies de *Listeria* ambiental. Fornece resultados quantitativos de espécies de *Listeria* spp. das amostras ambientais em apenas 28±2 horas. Nenhuma etapa de enriquecimento é requerida (3M MICROBIOLOGY, 2005).

Segundo Almeida e Almeida (2000), métodos futuros de diagnóstico devem ser específicos para cepas patogênicas de *L. monocytogenes*, pois nem todas as cepas de *L. monocytogenes* são virulentas conforme evidenciadas em estudos epidemiológicos e experimentais.

### 3.4.2. Análise Clínica

Para o diagnóstico clínico são utilizadas amostras de fluido espinhal, sangue, tecido nervoso, baço e fígado. O isolamento deve ser feito preferencialmente em ágar sangue para verificação da reação de  $\beta$ -hemólise e a identificação por provas bioquímicas, avaliando-se também a motilidade. O isolamento de *Listeria* spp. de sítios como placenta e líquido amniótico, em associação com sintomas clínicos pode sugerir listeriose neonatal. Culturas de *L. monocytogenes* a partir de fezes não auxiliam no diagnóstico já que o microrganismo pode ser eliminado por portadores saudáveis. Da mesma forma, os testes sorológicos não contribuem para o diagnóstico da listeriose, porque a reação dos anticorpos pode não ser específica (HOF; NICHTERLEIN; KRETSCHMAR, 1997; JAY, 2000).

### 3.5 TRATAMENTO E PROFILAXIA

O controle ou prevenção da contaminação por *L. monocytogenes* em alimentos é difícil, principalmente naqueles que não sofrem tratamento térmico durante o processamento, devido a elevada resistência fisiológica da bactéria. Por isso, as recomendações profiláticas especialmente direcionadas para as pessoas pertencentes aos grupos de risco como idosos, imunocomprometidos e gestantes são no sentido de evitar o consumo de produtos crus ou mal cozidos e relacionados a surtos de listeriose (FDA/USA/CDC, 2005).

A capacidade de colonização, multiplicação e formação de biofilmes nos equipamentos de plantas processadoras de alimentos torna este microrganismo uma ameaça à indústria (RØRVIK et al., 2003). Dessa forma, cuidados especiais, como adoção de boas práticas de higiene durante as etapas de produção de alimentos, associadas às técnicas de preservação do produto final tornam-se imprescindíveis para a obtenção do alimento seguro (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Provavelmente, os hábitos alimentares contemporâneos contribuíram para aumentar a listeriose, já que a sua natureza psicrotrofica permite a multiplicação durante o armazenamento e a distribuição sob refrigeração (DOYLE,

1988). Além disso, as condições sanitárias deficientes durante o abate dos animais, o cozimento inadequado, o armazenamento impróprio e a falta de higiene durante o preparo dos alimentos são fatores que podem predispor os indivíduos a enfermidades transmitidas por alimentos ou a se tornarem portadores assintomáticos (KASNOWSKI, 2004).

Em decorrência disso, a presença de listeriose em humanos e animais culmina em condições que contribuem para a diminuição da produção e da oferta de bens e serviços de uma população e, muitas vezes, significa uma barreira para as exportações, influenciando significativamente na economia do país (KASNOWSKI, 2004).

Nesse contexto, essas enfermidades se constituem em uma grande preocupação para as indústrias alimentícias e órgãos oficiais de regulamentação em termos de segurança de alimentos (KASNOWSKI, 2004).

#### **4 EPIDEMIOLOGIA**

De acordo com Hofer (2000), os sorovares predominantes de linhagens de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes fontes no Brasil, entre 1971 e 1997, foram usualmente limitados ao 4b, 1/2a e 1/2b e, menos freqüentemente, 4a, 1/2c e 4ab. Esse autor demonstrou que a caracterização antigênica representada por 13 sorotipos tem limitações para análise epidemiológica, devido à prevalência de um número discreto de sorovares na maioria das fontes de isolamento. Isso naturalmente não invalida o processo de investigação epidemiológica, uma vez que ele é fundamental para a determinação do perfil fenotípico. Da mesma forma, existem alguns obstáculos, como por exemplo, a grande proporção de linhagens de *L. monocytogenes* não tipáveis do sorogrupo 1/2 (McLAUCHLIN, 1996; HOFER, 2000), independentemente da adição de novas preparações fágicas ao esquema, como contraposição ao sucesso relativo da fagotipagem para o sorovar 4b (ESTELA; SOFOS, 1993, citado por HOFER, 2000). Esses problemas foram observados em uma parte das amostras investigadas por Hofer (2000), oriundas mais freqüentemente de fontes humanas.

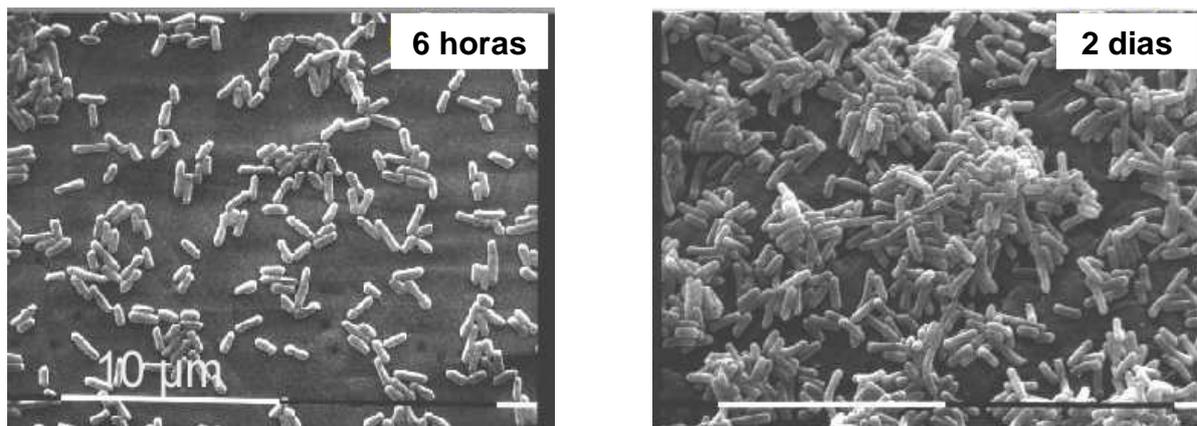
Epidemiologicamente, ainda segundo Hofer (2000), a distribuição dos sorovares de *L. monocytogenes* no Brasil demonstra a prevalência do sorotipo 4b de origem humana e de alimentos, diferentemente dos dados relatados por Nicolas et al. (1989), Farber e Peterkin (1991) e McLauchlin (1997), onde a prevalência é do sorotipo 1/2a em países da Europa.

É provável que alimentos processados possam ser contaminados por *L. monocytogenes* e outras espécies de *Listeria* por meio de equipamentos usados na produção, pois existem relatos de persistência desta bactéria na indústria de alimentos (LUNDÉN; AUTIO; KORKEALA, 2002; LIN et al., 2006).

Observa-se a freqüência de *L. monocytogenes* em plantas processadoras de alimentos, prevalecendo principalmente em lugares inacessíveis durante os procedimentos de limpeza (HOOD; ZOTTOLA, 1995). Este microrganismo já foi isolado de canais de escoamento, reservatórios de água, superfícies e fundos de contato com o alimento (LUNDÉN; AUTIO; KORKEALA, 2002).

Sob determinadas condições, *L. monocytogenes* pode se aderir a superfícies abióticas, com àquelas que entram em contato com alimentos durante o processamento, incluindo plástico, polipropileno, borracha, aço inoxidável e vidro. Esta agregação de resíduos orgânicos em superfícies, como restos de alimentos decorrentes da má higienização se constituem como fontes de energia para que microrganismos, como bactérias e fungos, possam se aderir e encontrar um meio de cultura adequado para iniciar a multiplicação. Decorrente dessa multiplicação, há formação de polímeros extracelulares e outros catabólitos que, ao serem formados, se juntam ao substrato existente, aumentando o poder de adesão de outros microrganismos. Esta massa composta de resíduos, microrganismos e seus produtos extracelulares, recebe o nome de Biofilme (BERESFORD; ANDREW; SHAMA, 2001).

Os equipamentos utilizados na manipulação de produtos prontos para o consumo, como máquinas de fatiar, são locais onde a bactéria pode aderir-se e tornar-se membro da microbiota local por um longo período de tempo, podendo permanecer no ambiente de processamento durante meses ou anos (LUNDÉN; AUTIO; KORKEALA, 2002) (FIGURA 3).



**FIGURA 3.** Evolução entre 6 horas e 2 dias na formação de biofilme de *Listeria monocytogenes* em superfície de aço inoxidável (Fonte: [www1.clermont.inra.fr](http://www1.clermont.inra.fr)).

A adesão da bactéria a superfícies abióticas depende de fatores microbiológicos, físicos, químicos e do tipo de superfície (HILBERT et al., 2003). Dentre estes fatores podemos citar: pH, temperatura, força iônica, características físicas e químicas da superfície e estado fisiológico da cultura (GUERRA et al., 2005).

As principais vias de entrada desse patógeno na indústria de laticínios são o leite cru, o solo carregado pelas botas e roupas dos trabalhadores, o ar, o sistema de ventilação, a água empoçada e/ou condensada, os carros de transporte, os utensílios e os equipamentos contaminados (SWAMINATHAN, 2001).

Nos Estados Unidos, Pritchard, Flanders e Donely (1995) avaliaram 21 indústrias de laticínios e constataram a incidência de *L. monocytogenes* em cerca de 9,2% das amostras. Em relação aos focos de contaminação, a porcentagem das amostras do ambiente de processamento representou 49,7%, enquanto que dos equipamentos foi de apenas 7,0%. Isolou-se a bactéria de equipamentos, como: superfícies de bancadas, tanque de armazenamento, transportadora, pá para filagem da massa, máquina para filtragem de salmoura, envasadora; e, em amostras ambientais, como salas de recebimento, congelamento, resfriamento e estocagem do leite cru. Na Austrália, Sutherland e Porrit (1996) descreveram a presença de *L. monocytogenes* em indústrias de laticínios. A bactéria foi detectada em superfícies de contato direto com os produtos, esteiras transportadoras, além de pisos e drenos.

No estudo de Kabuki et al. (2004), foram avaliadas três indústrias processadoras de queijos frescos tipo hispânico, nos Estados Unidos, e constataram a presença da *L. monocytogenes* em 6,3% dos queijos, e em 11% das amostras ambientais, tais como, tubos de conexões de plástico, caixas vazadas, superfícies de mesas, embalagem de leite, drenos e pisos.

No continente europeu, no Norte da Irlanda, Kells e Gilmour (2004) avaliaram duas plantas de processamento de leite e constataram ocorrência de *L. monocytogenes* em cerca de 22% das amostras de leite cru, em 6,0% dos equipamentos e em 41 % das amostras do ambiente de processamento. Foram consideradas as principais fontes de contaminação por essa bactéria os drenos e as escadas de aço inoxidável. Na Espanha, em indústrias processadoras de queijos, *L. monocytogenes* foi isolada de leite cru, além de amostras ambientais, como: pisos e drenos da sala de produção, prensa, prateleiras de madeira da sala de maturação e equipamento de embalagem (MENENDEZ et al., 1997). Na Itália, Gianfranceschi et al. (2003) avaliaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos e no ambiente de processamento, no período de 1990 a 1999, e verificaram que a incidência dessa bactéria em produtos lácteos foi de 17,4% (88/505).

Makino et al. (2005) constataram a presença de cepas de *L. monocytogenes* sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b em uma unidade produtora de queijos no Japão. A contaminação foi constatada em diversas amostras do ambiente de processamento, tais como: tanque de resfriamento do leite, sala de produção e cura, dreno e fezes de trabalhadores.

No Brasil também existem estudos que atestam a presença de *L. monocytogenes* em diversos pontos da planta de processamento. Em Fortaleza, a bactéria foi detectada em leite cru, fresco e refrigerado, leite pasteurizado (após 60 horas de estocagem a 4 °C), tanque de recepção do leite cru, caixas plásticas de transporte de leite e em drenos e pisos de uma indústria beneficiadora de leite tipo C (FIGUEIREDO, 2000). Na Bahia, Silva et al. (2003) observaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em 2 das 218 amostras analisadas de duas indústrias processadoras de queijo Minas Frescal, o que representa cerca de 1,0% do total. A bactéria foi detectada no leite cru e no piso da sala de estocagem de leite, em apenas uma das indústrias. Em Juiz de Fora, Brito et al. (2008)

avaliaram uma indústria processadora de queijo Minas Frescal e isolaram *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a, de mesmo perfil genético, em queijos, equipamentos e utensílios. Os autores concluíram que o refrigerador de estocagem era a fonte de contaminação dos queijos.

A formação de biofilmes em instalações industriais pode levar ao aumento dos custos na produção e reduzir a vida de prateleira dos alimentos. Entretanto, o maior problema da formação de biofilme é a contaminação dos alimentos que pode trazer riscos a saúde dos consumidores (GUERRA et al., 2005).

#### 4.1 OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes* EM ALIMENTOS

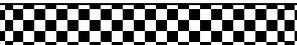
O fato da *L. monocytogenes* ser passível de isolamento em alimentos processados do tipo “pronto para consumo”, além da existência de grupos de risco tem despertado o interesse da indústrias de alimentos, autoridades de Saúde Pública e de pesquisadores em vários países. Devido a natureza psicrotrófica de *L. monocytogenes* a preocupação tornou-se ainda maior, pois o risco de listeriose aumenta na proporção direta da produção crescente de alimentos frescos e processados, prontos para o consumo, e que usualmente são conservados sob temperatura de refrigeração (LOGUERCIO et al., 2001).

*L. monocytogenes* é o agente etiológico de aproximadamente 98% dos casos observados em pessoas e 85% dos que ocorrem em animais (JAY, 2005). Os estudos e procedimentos para enumeração de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em alimentos têm aumentado muito nos últimos anos.

A *L. monocytogenes* tem sido isolada de diferentes alimentos, tais como: leite cru e pasteurizado, queijos, carne bovina, suína, de aves, peixes, embutidos, carne moída de diferentes animais, produtos cárneos crus e termoprocessados, além de produtos de origem vegetal, de origem marinha e refeições preparadas (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

No Brasil, *Listeria* têm sido isolada em vários estados, e em diversos produtos de origem animal (lácteos, cárneos, pescados) e vegetal, conforme pode ser observado no Quadro 2:

**QUADRO 2.** Distribuição das amostras (%) de *Listeria* segundo a fonte de isolamento e as origens geográficas.

 Estados	Produtos				
	Lácteos n (%)	Cárneos n (%)	Pescado n (%)	Vegetal n (%)	Total n (%)
Goiás	15 (0,6)	1371 (58,8)	-	-	1386 (59,4)
Minas Gerais	6 (0,2)	398 (17,1)	-	-	404 (17,3)
São Paulo	146 (6,2)	158 (6,7)	-	-	304 (13,0)
Rio de Janeiro	18 (0,7)	133 (5,7)	-	6 (0,2)	157 (6,7)
Rio Grande do Sul	48 (1,8)	25 (1,0)	3 (0,1)	-	71 (3,0)
Santa Catarina	-	-	8 (0,3)	-	8 (0,3)
Total	228 (9,7)	2085 (89,4)	11 (0,4)	6 (0,2)	2330 (100)

n = número de amostras

Fonte: Hofer, 2001.

Em um trabalho desenvolvido em Portugal por Mena et al. (2004), diversos tipos de alimentos foram analisados quanto à presença de *L. monocytogenes*. Das 1035 amostras (carne, peixes crus, leite e alimentos termicamente processados e fermentados), 72 (7,0%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Do total de alimentos analisados, a carne de frango crua obteve o maior número de amostras positivas, cerca de 60,0%.

Um estudo conduzido em diferentes indústrias e mercados no norte da Espanha, *L. monocytogenes* foi isolada em 307 das 3.685 amostras de vários produtos alimentícios (frango cru e processado, carne crua e cozida, peixe defumado, vegetais congelados, leite cru e processado e outros), coletadas durante quatro anos. Das amostras positivas, 285 representavam alimentos prontos para consumo. Isto quer dizer que estes produtos iriam ser consumidos sem prévio tratamento térmico, o que torna este fato preocupante para a saúde pública. É preciso um cuidado especial para evitar a contaminação pós-processamento (VITAS; AGUADO; JALON, 2004).

Yucel, Citak e Gundogan (2000) isolaram *L. monocytogenes* em 8,25% das amostras de três tipos de carne crua: carne moída, carne de frango e carne bovina. Das nove cepas de *L. monocytogenes* isoladas, duas foram obtidas a partir das amostras de carne moída, cinco da carne de frango e duas da carne bovina. Em relação às outras espécies isoladas, 90,0% eram *L. innocua* e 1,2% *L.*

*welshimeri*. Das 98 cepas de *L. innocua*, 49, 26 e 23 foram isoladas das amostras de carne moída, carne de frango e carne bovina, respectivamente.

Um produto de origem animal que desperta atenção na indústria de alimentos devido a alta probabilidade de conter microrganismos patogênicos é a lingüiça mista do tipo frescal, devido a fatores como: intensa manipulação, elevada atividade de água e não ser submetida a tratamento térmico. Em estudo realizado por Silva et al. (2004) no Rio Grande do Sul, foi detectada *Listeria* spp. em todas as 41 amostras analisadas. Analisou-se a matéria-prima utilizada no preparo da lingüiça, os equipamentos da linha de processamento e o produto final. *Listeria monocytogenes* foi encontrada em 29,3% das amostras e, inclusive no produto final, demonstrando a necessidade de readequação das práticas de limpeza e sanificação da planta de processamento.

#### 4.2 OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes* EM QUEIJOS

Dentre os alimentos citados anteriormente, a *L. monocytogenes* é freqüentemente encontrada em produtos lácteos. Os queijos, em especial, devido à sua composição, constituem-se em excelentes substratos para o crescimento do microrganismo. Dentre os queijos amplamente consumidos no Brasil podemos citar o do tipo Coalho e Minas Frescal. Estes produtos apresentam média e alta umidade, o que significa um teor de água livre maior no alimento. Portanto, são produtos perecíveis susceptíveis aos fenômenos bioquímicos e microbiológicos que afetam as suas características de qualidade, rendimento e durabilidade apresentando uma vida de prateleira curta, mesmo sob condições adequadas de refrigeração (NALDINI, 2002).

Estudos sobre a incidência de *L. monocytogenes* relatam a prevalência dessa bactéria em diferentes tipos de queijos em diversos países, como mostra a Tabela 1.

Os dados da Tabela revelam uma grande variação (zero a 46 %) na prevalência do patógeno em queijos. As maiores taxas de ocorrência são observadas em queijo macio (PINTADO et al., 2004) e queijos frescos (SILVA; HOFER; TIBANA, 1998). Evidencia-se, ainda, que no Brasil, os queijos dos tipos

Coalho e Minas Frescal, são os mais estudados com relação à contaminação por *L. monocytogenes*.

**TABELA 1.** Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos de vários países.

Amostra	Nº amostras positivas / Total (%)	País	Referência
Queijo Minas Frescal	2/20 (10,0)	Brasil	Destro et al. (1991)
Queijo Frescal	2/30 (6,7)	Brasil	Furlanetto et al. (1996)
Queijo Minas Frescal	7/17 (41,1)	Brasil	Silva et al. (1998)
Queijo macio	14/73 (19,0)	Dinamarca	Nørrung et al. (1999)
Queijo panela	3/20 (15,0)	Estados Unidos	Saltijeral et al. (1999)
Queijos macios/semi-macios	23/374 (6,0)	Europa	Rudolf e Scherer (2001)
Queijo macio	20/256 (0,8)	Chile	Cordano e Rocourt (2001)
Queijos	2/74 (2,7)	Bélgica	De Réu et al. (2002)
Queijo Coalho	1/17 (5,9)	Brasil	Leite et al. (2002)
Queijo Coalho	1/43 (2,3)	Brasil	Borges et al. (2003)
Queijo Coalho	16/84 (19,0)	Brasil	Branco et al. (2003)
Queijo tipo Hispânico	3/2931 (0,2)	Estados Unidos	Gombas et al. (2003)
Queijo Coalho	1/58 (1,7)	Brasil	Ramos e Costa (2003)
Queijo Minas Frescal	2/218 (0,9)	Brasil	Silva et al. (2003)
Queijo fresco	3/74 (4,0)	Peru	Espinoza et al. (2004)
Queijos (leite cru)	6/371 (1,6)	Portugal	Mena et al. (2004)
Queijo fresco	2/50 (4,0)	Portugal	Mena et al. (2004)
Queijo fresco	7/111 (6,3)	Estados Unidos	Kabuki et al. (2004)
Queijo macio	29/63 (46,0)	Portugal	Pintado et al. (2004)
Queijo macio	1/99 (1%)	Itália	Vitas et al., 2004
Queijo Coalho	7/127 (5,5)	Brasil	Duarte et al. (2005)
Queijo artesanal	15/123 (12,2)	Japão	Makino et al. (2005)
Queijo gorgonzola	35/1656 (2,1)	Itália	Manfreda et al. (2005)
Queijo Coalho	2/70(2,8)	Brasil	Sousa et al. (2006)
Leite e queijo Coalho	0/140 (0,0)	Brasil	Borges et al. (2006)
Leite e produtos lácteos	80/2256 (3,5)	Hungria	Kis et al. (2006)
Ricota	3/45 (6,7)	Brasil	Esper (2006)
Queijo Turkish	2/157 (2,3)	Turquia	Aygun; Pehlivanlar (2006)
Queijo Minas Frescal	3/93 (3,2)	Brasil	Carvalho et al. (2007)
Ricota	3/80 (3,7)	Brasil	Zaffari et al. (2007)
Queijo Tulum	12/250 (4,8)	Turquia	Colak et al. (2007)
Queijos macios/semi-macios	6/90 (6,7)	Brasil	Abrahão et al. (2008)

**Fonte:** Adaptação de Borges et al., 2009

O queijo Minas Frescal é um dos queijos mais populares produzidos no Brasil. Sua maior característica é o agradável gosto ácido. É um queijo fresco, macio, altamente perecível e possui validade curta, mesmo sob refrigeração. Em um dos estudos apresentados na Tabela 1, Silva, Hofer e Tibana (1998)

observaram maior incidência de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal artesanal (7/17), elaborado a partir de leite cru, em relação ao industrial, produzido a partir de leite pasteurizado (1/17).

Em outra pesquisa, de acordo com o fluxograma de fabricação do queijo Minas Frescal, Silva et al. (2003) coletaram amostras em diferentes etapas do processamento deste queijo (recepção do leite cru, pasteurização, coagulação e estocagem). De um total de 218 amostras coletadas, 13 foram positivas para *Listeria* spp., sendo duas caracterizadas como *L. monocytogenes*.

Em relação ao queijo do tipo Coalho, este trata-se de produto popular e que faz parte da cultura da Região Nordeste do Brasil. É fabricado com massa semicozida e tradicionalmente consumido fresco ou maturado. É produzido há mais de 150 anos, principalmente em estados nordestinos, a partir de leite de vaca cru e/ou leite pasteurizado. Antigamente, utilizava-se para coagulação do leite o coalho do estômago seco e salgado de animais silvestres ou bezerros. Atualmente, esta prática foi substituída pelo uso de coalho industrial. Em geral, o formato deste queijo é retangular e o seu peso varia entre 1,0 e 5,0 kg (LIMA, 1996).

A tecnologia utilizada na produção do queijo Coalho é de caráter empírico e o seu processamento é ainda artesanal, sendo deste modo mais susceptível a contaminação microbiana. A maioria dos queijos do tipo Coalho é fabricada em pequenas fazendas rurais e/ou em pequenas queijarias urbanas ou rurais sem cuidados higiênico-sanitários adequados, o que pode representar falta de segurança microbiológica e padronização da qualidade (FEITOSA et al., 2003).

Em queijo do tipo Coalho, a incidência de *L. monocytogenes* apresenta ampla variação (zero a 19%), tanto para queijos artesanais como para industrializados. Na região Nordeste (NE) do Brasil, foram analisadas 127 amostras de queijo tipo Coalho, produzidos e comercializados no Estado de Pernambuco, das quais 9,5% foram positivas para *Listeria* spp. e 5,5% positivas para *Listeria monocytogenes* (DUARTE et al., 2005). No estado do Ceará (NE), foram analisadas 70 amostras de queijo artesanal tipo Coalho coletadas em mercados da cidade de Fortaleza. Os resultados mostraram uma incidência de 12 (17,1 %) amostras contaminadas por *Listeria* spp. sendo duas positivas para *L. monocytogenes* (SOUSA et al., 2006). Ainda na cidade de Fortaleza, outro estudo

investigou 84 amostras de queijo de Coalho industrializado, e demonstrou que 16 amostras (19%) estavam contaminadas com *Listeria monocytogenes*, 5 (5,9%) com *Listeria innocua* e 1 (1,2%) com *Listeria grayi* (BRANCO et al., 2003). Na cidade de Salvador, Bahia (NE), de 17 amostras analisadas de queijo tipo Coalho, a presença de *L. monocytogenes* foi evidenciada em uma delas (LEITE et al., 2002).

#### 4.3 PRINCIPAIS SURTOS ENVOLVENDO *Listeria monocytogenes*

A década de 80 foi marcada por uma série de surtos de listeriose na América do Norte e Europa, o que despertou a comunidade científica para os perigos que envolvem a doença. Alimentos foram implicados nestes surtos e, por isso, eles têm sido considerados a fonte primária da infecção por *Listeria monocytogenes*. A listeriose pode ser relatada em surtos ou em casos isolados. (SILVA; TIBANA, 1995).

O primeiro surto de listeriose de origem alimentar devidamente comprovado e documentado ocorreu em 1981, na América do Norte, em Nova Escócia, Canadá, com 41 doentes (sendo 34 perinatais e sete adultos) e 11 mortes. O alimento apontado como veículo de transmissão foi a salada contendo repolho; este estava contaminado porque foi cultivado a partir do uso de adubo *in natura* (fezes) proveniente de ovinos que estavam infectados por *L. monocytogenes* (LOGUERCIO et al., 2001).

Entre 30 de junho e 30 de agosto de 1983, 49 pacientes no Estado de Massachusetts, nos Estados Unidos, adquiriram listeriose. Sete casos ocorreram em fetos ou crianças e 42 em adultos imunossuprimidos, com taxa de letalidade de 29% (quatorze pessoas). Das 40 amostras de *L. monocytogenes* isoladas e testadas, 32 eram do sorotipo 4b. Estudos epidemiológicos revelaram que a doença estava fortemente associada com a ingestão de uma bebida elaborada com leite integral ou parcialmente desnatado, pasteurizada. O leite envolvido no surto teve origem em fazendas onde, de acordo com as anotações do médico veterinário, ocorreram casos de listeriose em algumas vacas em lactação na mesma época do surto. Muitos sorotipos de *L. monocytogenes* foram encontrados

no leite cru dessas fazendas após o surto. No local de beneficiamento do leite, nenhuma evidência de falha na pasteurização foi encontrada (FLEMING et al., 1985).

Em 1985 um grande surto ocorreu no sul da Califórnia, Estados Unidos, também relacionado com o sorotipo 4b de *L. monocytogenes*. Foram notificados 305 casos, com 105 mortes e segundo os investigadores, o surto foi causado por um tipo de queijo mole, denominado *Mexican-style*, produzido a partir de leite cru ou proveniente de processo de pasteurização inadequada (LINNAN et al., 1988). Nesse mesmo ano, em Los Angeles, nos Estados Unidos, foram confirmados 94 casos de listeriose, dos quais 37 eram neonatos e suas mães. Os alimentos implicados no surto foram: queijo tipo Mexicano, sorvete e iogurte; e a taxa de letalidade foi de 31% (MASCOLA et al., 1989).

O consumo de queijo macio Vacherin Mont-d'Or produzido a partir de leite cru, causou surtos de listeriose na Suíça entre 1983 a 1987. Nesse período, ocorreram 122 casos da doença, com 34 mortes. No inverno, era observado um aumento na ocorrência de listeriose. Os mesmos sorotipos (4b) e fagotipos de *L. monocytogenes* foram identificados em pacientes e no queijo (BÜLA; BILLE; GLAUSER, 1995).

No Reino Unido, entre os anos de 1987 a 1989, houve um aumento considerável na incidência de listeriose, subindo de aproximadamente 100 casos por ano para cerca de 300 casos em 1989 (McLAUHLIN, 1991). Nesse período, descreveu-se uma contaminação associada à ingestão de um patê preparado a partir de emulsão de carnes, óleo, algumas especiarias e outros ingredientes, com identificação do sorotipo 4b em amostras do produto (McLAUHLIN, 1993).

Na Dinamarca, no período de 1989 a 1990, foram diagnosticados um surto e 69 casos de listeriose, sendo 26 causados pelo mesmo fagotipo. Na investigação epidemiológica, o surto foi associado a dois veículos, queijo maturado com fungo azul e queijo duro (LUNDÉN; AUTIO; KORKEALA, 2004).

Nos meses de março a dezembro de 1992, na França, ocorreu um surto envolvendo língua de suíno cozida em molho, que desencadeou também uma contaminação cruzada em produtos de *delicatessen*. Foram relatados 279 casos, com 63 mortes e 22 abortos (GOULET et al., 1995). Também nesse mesmo ano foi relatado outro surto, tendo como veículo mexilhões

comercializados na cidade de Nova Zelândia. Os sorotipos isolados foram 1/2a e 4b (BACKER; BRETT; SHORT, 1993).

Em 1995, houve um surto de listeriose na França com 37 casos associados ao consumo de queijo tipo Brie de Meaux, fabricado a partir de leite cru (GOULET et al., 1995). Neste mesmo ano, nos Estados Unidos, um caso de listeriose foi associado ao consumo de leite achocolatado, acometendo 45 pessoas com sintomas de gastroenterites; a maioria apresentou diarreia (79%) e febre (72%) aproximadamente 20 horas após a ingestão do produto. Quatro pessoas foram hospitalizadas (BACKER; BRETT; SHORT, 1993).

Entre 1998 e 1999, manteiga de leite pasteurizado foi veículo de um surto de *L. monocytogenes*, na Finlândia. Os isolados de *L. monocytogenes* provenientes dos pacientes, das amostras de manteiga, dos equipamentos e do ambiente de processamento apresentaram o mesmo perfil eletroforético. A maioria dos casos estava relacionada a indivíduos imunossuprimidos, hospitalizados na “Helsinki University Central Hospital” (HUCH). A manteiga contaminada também foi vendida para dez outros hospitais centrais e para o comércio varejista da região (LYYTIKÄINEN et al., 2000).

Na Carolina do Norte, nos Estados Unidos, entre 2000 e 2001, houve um surto de listeriose causado pelo consumo de queijo tipo Mexicano artesanal, elaborado a partir de leite cru, contaminado por *L. monocytogenes*, com 12 casos diagnosticados: um homem imunossuprimido e 11 mulheres (idade média de 18-28 anos), sendo que destas dez estavam grávidas. A infecção resultou em cinco abortos, três nascimentos prematuros e dois recém-nascidos infectados (MacDONALD et al., 2005).

Em Paris, França, no ano 2000, foi relatado um surto associado a língua de porco defumado, processada em uma indústria, causando a morte de sete pessoas. As investigações apontaram que outros alimentos como presunto, também estavam contaminados com *L. monocytogenes*, provavelmente devido ao uso de uma faca usada para fatiá-lo ter entrado em contato com a língua de porco defumada (DOROZYNSK, 2000).

No ano de 2001, ocorreu na Suécia um surto, no qual 48 pessoas apresentaram gastroenterite depois de consumirem produtos lácteos manufaturados em uma fazenda. As investigações epidemiológicas constataram

que o leite cru utilizado para a elaboração de queijo fresco estava contaminado por *L. monocytogenes*. A genotipagem revelou que as cepas isoladas dos pacientes e dos produtos lácteos eram idênticas. Outros patógenos, como *Escherichia coli* Enteropatogênica e *Staphylococcus* coagulase positiva, também, foram isolados das amostras dos produtos (CARRIQUE-MAS et al., 2003).

No Japão, em 2001, ocorreu um surto de listeriose não-invasiva, com acometimento em 84 pessoas. *L. monocytogenes* sorotipo 1/2b foi isolada de amostras de queijo (tipo do Japão), do ambiente de processamento e de fezes dos pacientes. As investigações epidemiológicas e a genotipagem das cepas evidenciaram que o surto foi causado pelo consumo do queijo (MAKINO et al., 2005).

Em 2002, ocorreu um surto de listeriose no Canadá, no qual foram envolvidas 17 pessoas. As investigações epidemiológicas atribuíram o surto ao consumo de queijo maturado por 60 dias, produzido a partir de leite submetido a tratamento térmico insuficiente (GAULIN et al., 2003).

Um dos mais recentes surtos relatados ocorreu em 2007, em Massachusetts, Estados Unidos, envolvendo cinco pessoas, e resultando na morte de três idosos. O alimento associado foi leite pasteurizado adquirido de um laticínio local (CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2008).

A grande maioria dos casos diagnosticados concentram-se nos Estados Unidos e na Europa. E, pode-se perceber, que ao longo dos anos o número de casos notificados vem crescendo, possivelmente pela melhoria dos métodos para diagnóstico em laboratório, juntamente com o aumento da população susceptível, alta prevalência da bactéria no ambiente e hábitos inadequados de manuseio, preparo e armazenamento dos alimentos (KASNOWSKI, 2004). No Brasil, surtos e casos esporádicos de listeriose causados por alimentos ainda não foram descritos, embora a ocorrência de *L. monocytogenes* tenha sido relatada em vários tipos de alimentos.

Como pode ser verificado na Tabela 2, uma grande variedade de alimentos tem sido associados à contaminação por *L. monocytogenes*.

**TABELA 2.** Surtos e casos esporádicos suspeitos e comprovados de listeriose alimentar.

<b>Ano</b>	<b>Origem</b>	<b>Casos/ Mortes</b>	<b>Localização</b>
1953	Leite cru	2/1	Alemanha
1966	Leite/derivados	279/109	Alemanha
1980	Mariscos	22/6	Nova Zelândia
1981	Repolho	41/18	Canadá
1983	Leite pasteurizado	49/14	Boston
1983-87	Queijo tipo <i>Vacherin</i>	122/34	Suíça
1985	Queijo Mexican <i>style</i>	142/48	Califórnia
1986-87	Vegetais	36/16	Filadélfia
1987-89	Patê	366/63	Reino Unido
1987	Queijo	1	Reino Unido
1988	Queijo de leite de cabra	1	Reino Unido
1988	Frango assado	1	Reino Unido
1988	Frango assado	2	Reino Unido
1988	Embutido de peru	1	Oklahoma
1989	Embutido de porco	1	Itália
1988	Alfafa	1	Canadá
1989	Cogumelos salgados	1	Finlândia
1989	Camarão	9/1	Estados Unidos
1989	Embutido de porco	1	Itália
1989/1990	Queijo azul	26/0	Dinamarca
1990	Leite cru	1	Vermont
1990	Embutido de porco	1	Itália
1990	Patê	11/6	Austrália
1991	Mexilhão defumado	3/0	Austrália
1992	Mexilhão defumado	4/2	Nova Zelândia
1992	Carne de ovinos	1	Canadá
1992	Língua de porco	279/85	França
1993	Filetes de porco	39/0	França
1994	Achocolatado	52/0	Estados Unidos
1994	Azeitonas em conserva	1	Itália
1995	Queijo <i>Brie</i>	17/0	França
1995	Queijo macio	37/11	França
1998-99	Salsicha tipo <i>hot-dog</i>	101/21	Estados Unidos
1998/1999	Manteiga	80/4	Finlândia
2000/2001	Queijo tipo mexicano	13/0	Estados Unidos
2001	Queijo	86/0	Japão
2002	Queijo	17/0	Canadá
2007	Leite pasteurizado	5/3	Estados Unidos

**Fonte:** Adaptação de Jay, 2000 e Borges et al., 2009.

Nos surtos de listeriose, a letalidade pode atingir cerca de 40% dos casos; e, caso o quadro de meningite esteja instalado essa taxa pode chegar a 70% e, nas septicemias, 50% (GERMANO; GERMANO, 2001).

## 5 LEGISLAÇÃO

A legislação sobre alimentos surgiu em muitos países para prevenir a venda de produtos fraudulentos, preocupando-se inicialmente com os defeitos de composição e peso. Atualmente, tem se estendido para outros aspectos da saúde pública, como os que se referem à transmissão das bactérias patogênicas através de alimentos, no intuito de garantir a segurança e a qualidade destes. O *Codex Alimentarius* da Food Agricultural Organization (FAO) é tido como ponto de referência para os consumidores, produtores e processadores de alimentos, para agências nacionais de controle de alimentos, bem como para o comércio internacional de produtos alimentícios (GERMANO et al., 2000).

Como a dose mínima infectante de *L. monocytogenes* é ainda desconhecida, alguns países têm estabelecido limites legais e estabelecido padrões para a quantidade do patógeno em alimentos, especialmente os prontos para consumo.

Os Estados Unidos possuem a legislação mais rígida considerando *L. monocytogenes* um “adulterante” isto significa que, quando é detectada a presença do patógeno em um alimento o mesmo é considerado adulterado e, portanto sujeito a *recall* e/ou apreensão. É a política conhecida como “tolerância zero” determinada pela ausência do patógeno em 25 gramas(g) da amostra (JAY, 2000).

A diretiva da Comunidade Européia sobre leite e derivados determina o padrão de “tolerância zero” para queijos moles e ausência de *L. monocytogenes* em 1grama dos outros produtos. Na Grã Bretanha, determinaram-se padrões para alguns alimentos prontos para o consumo estabelecendo grupos baseados no número de *L. monocytogenes* presentes. Quando o microrganismo não é detectado em 25 g o alimento é considerado satisfatório; entre  $10^2$  e  $10^3$ UFC/25g é considerado insatisfatório e acima de  $10^3$ UFC/25 g o alimento é considerado inaceitável (JAY, 2000).

No Brasil, a legislação brasileira não prevê limites de tolerância para a presença do microrganismo em carnes e produtos cárneos e a Resolução da Diretoria Colegiada, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA-RDC no. 12/2001) aprovou o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, e somente estabeleceu a pesquisa de *L. monocytogenes* (ausência em 25g) para queijos de média a muito alta umidade (BRASIL, 2001).

Segundo Jay (2005), a Comissão Internacional em Especificações Microbiológicas para Alimentos (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods – ICMSF*) parece ter concluído que, se esse microrganismo não exceder 100 UFC/g de alimento, pode ser considerado aceitável para indivíduos que não estão sob risco.

## 6 ANTIMICROBIANOS NATURAIS

Os métodos tradicionais para o controle de microrganismos nos alimentos, como tratamentos intensos de calor, congelamento, acidificação, desidratação e adição de sal e agentes químicos vem sendo substituídos por técnicas alternativas pela indústria de alimentos. Nos últimos anos, as tecnologias mais estudadas são as de inativação de microrganismos por métodos não-térmicos, como o uso de alta pressão hidrostática, utilização de pulsos eletromagnéticos, sistemas de embalagens ativas ou com atmosfera modificada, utilização de compostos antimicrobianos naturais e bioconservação (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Ainda, nos últimos anos, os consumidores passaram a exigir alimentos mais naturais, sem conservantes químicos e com longa vida útil (PRANOTO; RAKSHIT; SALOKHE, 2005). Segundo Rodgers (2001) a utilização de agentes químicos para a conservação de alimentos não é compatível com a imagem de produtos “frescos”.

Uma das vantagens do uso de antimicrobianos naturais é a imagem de produto natural. Porém, a eficiência de seu uso depende de diversos fatores, como difusão em matrizes sólidas, solubilidade em meio aquoso, interação com os componentes do alimento (proteínas, carboidratos e lipídios), a eficácia como agente antimicrobiano e alterações nas características sensoriais (sabor e textura,

principalmente). Outro aspecto a ser levado em consideração é o espectro de atividade antimicrobiana e o surgimento de bactérias resistentes ao composto antimicrobiano natural (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

## 6.1 BACTERIÓFAGOS

Os vírus que infectam bactérias foram descobertos independentemente por Frederick W. Twort, na Inglaterra, em 1915, e por Félix d'Herrelle, no Instituto Pasteur, em Paris, em 1917. Twort observou que as colônias bacterianas algumas vezes dissolviam-se e desapareciam porque ocorria lise ou rompimento das células. A observação mais importante foi a de que o efeito lítico poderia ser transmitido de colônia a colônia. Mesmo material altamente diluído, proveniente de colônia lisada, que havia passado por meio de filtro capaz de reter bactérias, poderia lisar outras bactérias. A partir destas observações, Twort cautelosamente sugeriu que o agente lítico deveria ser um agente infeccioso filtrável (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997).

Quando d'Herrelle descobriu este fenômeno (e por isso fenômeno Twort-d'Herrelle), designou o agente de bacteriófago – do grego "comedor de bactéria". Ele concluiu que o agente filtrável era uma entidade minúscula – um vírus, que parasitava bactérias (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997).

Os bacteriófagos, também conhecidos como "fagos", como todos os vírus, não apresentam um ciclo metabólico próprio e dependem do hospedeiro para se manterem e replicarem. Como tal, o ciclo de vida de um bacteriófago ocorre na sua totalidade no interior da célula bacteriana hospedeira. Com base no tipo de ciclo de vida, os bacteriófagos podem ser de dois tipos: fagos líticos, que apresentam um ciclo de vida lítico; ou fagos temperados, que apresentam ciclo de vida lisogênico e lítico (HANLON, 2007; MATSUZAKI et al., 2005; BERNHARDT et al., 2002).

Os bacteriófagos temperados podem realizar um ciclo de vida lisogênico. Os fagos adsorvem à superfície bacteriana, através do reconhecimento de receptores presentes na parede celular e posteriormente injetam o genoma viral na célula hospedeira. O DNA fágico pode, na maioria dos casos, integrar-se no genoma bacteriano e a replicação do genoma viral ocorre quando da replicação do genoma bacteriano, passando para todas as células filhas durante a divisão celular. Em

determinadas condições, o genoma viral é expulso do cromossoma bacteriano podendo ocorrer um ciclo lítico (YOUNG, 2005).

No ciclo de vida lítico, as primeiras fases, a adsorção e injeção do DNA, são comuns ao ciclo de vida lisogênico. Depois de atingir o citoplasma, o DNA viral começa a expressar proteínas essenciais à rápida replicação do DNA fágico, seguida da transcrição de genes tardios que codificam para os componentes estruturais. Posteriormente, ocorre o encapsulamento do genoma viral, levando à formação de partículas virais que se vão acumulando no citoplasma bacteriano. Os novos fagos são libertados após a lise celular, mediada pela produção das proteínas tardias holina e endolisina (YOUNG, 2005).

Os bacteriófagos são os seres mais abundantes no ambiente, sendo portanto, inimigos naturais das bactérias e são candidatos adequados para o biocontrole desses patógenos no ambiente e em alimentos (CARLTON et al., 2005).

Em todo o mundo, o aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos tem sido responsável por um interesse renovado na terapia com fago no mundo ocidental. A melhoria do conhecimento sobre a ecologia do fago, a natureza das infecções, e métodos laboratoriais resultaram em um grande número de publicações documentando o sucesso da terapia com fago em experimentos com animais. Algumas experiências indicam que a terapia com fago pode ser superior ao tratamento com antibióticos (BRUTTIN; BRUSSOW, 2005).

Os bacteriófagos contribuem para a homeostase bacteriana na natureza, mantendo as bactérias sob controle. Muitos deles, não afetam bactérias desejáveis nos alimentos (por exemplo, fermentativas) e comensais no trato gastrintestinal. Além disso, são inofensivos para os seres humanos, animais e plantas; visam apenas as células bacterianas e não afetam nenhuma das propriedades do alimento, seja ela química, física ou organoléptica. Um estudo de toxicidade oral em ratos com doses elevadas de LISTEX P100 - fago para *Listeria*, não revelaram efeitos adversos (CARLTON et al., 2005), e um estudo em seres humanos, com fagos específicos de *Escherichia coli* capazes de infectar as cepas comensais como as patogênicas, não demonstraram qualquer efeito adverso (BRUTTIN; BRUSSOW, 2005).

Uma das mais importantes vantagens do biocontrole de bactérias patogênicas por fagos é a especificidade por um hospedeiro particular. A gama de hospedeiros de um fago é determinada pela sua entrada na célula, pela interação

com receptores celulares do hospedeiro e, posteriormente, por sistemas de restrição e modificação. A afinidade bem sucedida de um fago para com seu hospedeiro exige vínculo entre receptores específicos na superfície celular e antirreceptores no fago (HUDSON et al., 2005).

Os receptores típicos incluem a membrana externa, que transporta proteínas, lipopolissacarídeos, carboidratos e estruturas especializadas, como os flagelos. Alguns fagos podem se ligar a vários receptores ou a mais de um receptor simultaneamente (GOLDBERG; GRIUIUS; LETELLIER, 1994). Conseqüentemente, um patógeno, como *E. coli* O157:H7, pode ser infectado por um fago em particular, mas sorovares não-patogênicas estreitamente relacionadas podem permanecer inalteradas.

Com relação ao seu potencial de aplicação para biocontrole de patógenos indesejáveis nos alimentos e nos ambientes relacionados, deve ser considerado que os fagos são as unidades mais abundantes de autorreplicação no ambiente e estão presentes em quantidades significativa na água e nos mais diversos tipos de alimentos, particularmente nos fermentados (SULAKVELIDZE; BARROW, 2005). Na carne *in natura* e processada e em produtos derivados da carne, encontram-se freqüentemente mais de 10<sup>8</sup> células viáveis de fago por grama (KENNEDY; BITTON, 1987). É um fato que os fagos são rotineiramente consumidos com o alimento, em números significativos. Além do mais, também são organismos comensais normais do homem e dos animais e são abundantes, especialmente no trato gastrointestinal (BREITBART et al., 2003).

Os bacteriófagos são considerados como aditivos e reconhecidos como seguros para o consumo – GRAS (*General Recognized as Safe*). Não deixam prejuízos ecológicos - os fagos enfraquecem e se decompõem em aminoácidos e ácidos nucléicos, isto os torna agentes naturais para o controle de determinadas bactérias patogênicas, como *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter* e *E. coli* em alimentos (HAGENS; OFFERHAUS, 2008).

Estudos têm sido feitos para tratar frangos com bacteriófagos contra *Salmonella* (FIORENTIN; VIEIRA; BARION, 2005) e *Campylobacter* (ATTERBURY et al. 2007) e para tratar ruminantes, bacteriófagos contra *E. coli* patogênica (SHENG et al., 2006). Na maioria desses estudos, observou-se uma redução significativa da carga bacteriana. Uma redução próxima ao abate pode diminuir significativamente os riscos posteriores, e em qualquer caso, não se exclui o

tratamento adicional com fago em fases posteriores da produção de alimentos, fato que vários estudos têm mostrado ser altamente eficaz (LEVERENTZ et al., 2004).

Bacteriófagos foram encontrados reduzindo os números de *Salmonella* em queijo (MODI et al., 2001) e em frango (GOODE; ALLEN; BARROW, 2003; KOSTRZYNSKA et al., 2002), na ausência de crescimento bacteriano. A redução por fagos de *Salmonella Enteritidis* em fatias de melão foi independente da temperatura de armazenamento na faixa de 5 a 20°C (LEVERENTZ et al., 2001).

Um exemplo mais relevante foi encontrado nos estudos de *Campylobacter jejuni* (microrganismo termófilo; sem crescimento abaixo de 31°C e crescimento ótimo a 42°C). Os pesquisadores Goode, Allen e Barrow (2003) relataram uma completa erradicação na contaminação artificial com *C. jejuni* em pele de frango e armazenada a 4°C.

#### 6.1.1 Fatores que Interferem no Biocontrole Realizado por Bacteriófagos

Muitos alimentos são distribuídos sob refrigeração e a maioria dos agentes patogênicos de origem alimentar não se desenvolve nessas condições; é importante determinar se os fagos podem eliminar seus hospedeiros em alimentos refrigerados. Outras considerações da relação fago-hospedeiro incluem os efeitos da presença de organismos não-hospedeiros, a influência do pH e outras propriedades físico-químicas dos alimentos, a atividade em um substrato sólido ou biofilme, o surgimento de bactérias mutantes resistentes e os números de fagos e hospedeiros necessários para permitir a replicação (HUDSON et al., 2005).

Alguns autores têm desenvolvido argumentos questionando a eficácia de fagos como agentes antimicrobianos (JOERGER, 2003; SKLAR; JOERGER, 2001). A transdução dos fagos pode transferir características indesejáveis, como genes virulentos, de um organismo para outro, e a conversão lisogênica pode produzir células bacterianas que não são mais susceptíveis a ataques. Fagos por si só podem sofrer mutações de fagos líticos virulentos para fagos temperados, que geralmente formam uma associação não-lítica com as bactérias hospedeiras, resultando em lise de apenas uma pequena proporção da população. Embora esses fenômenos de transferência e conversão tenham sido documentados com patógenos de plantas e animais, não há provas de que eles ocorram em alimentos.

No entanto, existem evidências de que a bactéria de origem alimentar pode abrigar fagos temperados (ACKERMANN; GREER; ROCOURT, 1988). Portanto, quando usados em qualquer aplicação de biocontrole, os fagos devem ser cuidadosamente caracterizados para determinar se eles podem executar transdução generalizada ou se eles carregam qualquer gene de virulência que poderia ser expresso no hospedeiro antes da morte (HUDSON et al., 2005).

A utilização de misturas de fagos de distintas famílias pode ajudar a resolver problemas relacionados com a resistência bacteriana (LEVERENTZ et al., 2003; TANJI et al., 2004). Em uma investigação de controle do fago de *E. coli* O157: H7, O'Flynn et al. (2004) concluíram que a frequência de formação de mutantes bacterianos insensíveis ao fago era muito baixa e os mutantes apareceram para reverter a sensibilidade ao fago. Tanji et al. (2004) conduziram um estudo do mecanismo de resistência do fago em *E. coli* O157: H7 e verificaram que o uso de coquetéis de fagos com receptores celulares distintos reprimia o aparecimento da resistência.

Um obstáculo importante do biocontrole com fago é a exigência de uma densidade limiar de células bacterianas hospedeiras. A necessidade de populações bacterianas de 3 a 5 log UFC tem sido relatada para que o uso do fago possa ter um impacto sobre esses hospedeiros (GREER, 1988; KENNEDY; BITTON, 1987). Os números das células bacterianas alvo não seriam preocupantes em alimentos deteriorados, onde grandes populações de bactérias deteriorantes residem, mas seriam de fundamental importância no controle de patógenos em alimentos em que os números são normalmente mais baixos.

Essa exigência tem sido demonstrada por fagos que infectam *Pseudomas* em leite (ELLIS; WHITMAN; MARSHALL, 1973), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* em culturas (WIGGINS; ALEXANDER, 1985) e *Salmonella* no ceco de frango (BERCHIERI; LOVELL; BARROW, 1991). Esses autores concluíram que os fagos afetariam o seu hospedeiro somente quando a densidade deste ultrapasse em determinado limiar (cerca  $10^4$ /mL). No entanto, nos alimentos, Greer (1988) demonstrou que a atividade foi observada quando a densidade do hospedeiro foi de 46 células/ cm<sup>2</sup>.

Após uma série de publicações, entre 1982 e 1990, foi demonstrado o efeito preservativo de fagos de *Pseudomas* em carne refrigerada (GREER, 1986, 1988; GREER; DILTS, 1990). A interação dos fagos com as bactérias na superfície

das carnes não foi afetada pela temperatura (1 a 10°C), mas foi significativamente influenciada pelo número inicial de fagos e bactérias inoculados. Para um aumento máximo da vida útil da carne do varejo foi necessário uma densidade inicial de bactérias superior a 3 log UFC/ cm<sup>2</sup> e concentração de fagos superior a 7 log UFP/ cm<sup>2</sup> (GREER, 1988).

Um grande problema que pode advir do uso de fagos é a liberação de toxinas bacterianas oriundas da lise dessas células, mas isso também é observado com outras práticas usadas no controle do crescimento bacteriano (CARLTON et al., 2005).

Quando os fagos lisam as paredes das células bacterianas, eles o fazem através de enzimas (BERNHARDT et al., 2002); assim, a possibilidade de utilização de enzimas específicas codificadas para destruir bactérias responsáveis por intoxicações alimentares deve ser considerada. Uma endolisina de um fago de *L. monocytogenes* foi clonada em *Lactococcus lactis* e uma vez que o gene tinha sido fundido com um sinal peptídeo que permitiu que a proteína lítica fosse extravasada da célula, células de *L. monocytogenes* no meio circundante foram rapidamente lisadas (GAENG et al., 2000).

#### 6.1.2 Estabilidade dos Bacteriófagos nas Instalações de Processamento e em Alimentos

É preciso considerar alguns fatores nos alimentos e nos ambientes de processamento que podem vir a interferir no sucesso do biocontrole que utiliza os bacteriófagos como agentes. Por isso, é importante que os mesmos sejam estáveis sob condições como a temperatura, pH, luz visível e ultravioleta e sanitizantes.

*Temperatura:* A inativação térmica de colifagos em condições de laboratório geralmente ocorre em 60 a 75 °C e o efeito do estresse térmico pode ser variável (ADAMS, 1959 citado por HUDSON et al., 2005).

A sobrevivência de fagos termotolerantes aos processo de pasteurização é um importante ponto de entrada em indústrias de laticínios. No exame de fagos de *Lactobacillus helveticus* realizado por Quiberoni, Suarez e Reinheimer (1999) evidenciou-se que a termotolerância foi dependente do fago e do meio utilizado, com

alguns isolados inativados em temperaturas de pasteurização de 63 a 72 °C e outros exigindo tratamento a 90 °C.

Fagos isolados a partir de soro de queijo e iogurte requereram aquecimento a 90 °C durante cinco minutos para reduzir os números de  $10^6$ - $10^7$  UFP/mL para menos de 10 UFP/mL (BINETTI; REINHEIMER, 2000). Assim, como os fagos podem ser mais resistentes ao calor do que a maioria das bactérias vegetativas, eles podem sobreviver a tratamentos térmicos aplicados rotineiramente em alguns alimentos.

*Tolerância ao pH:* Estudos realizados indicaram que os bacteriófagos geralmente são estáveis no intervalo de pH entre 5 e 8; quando aliado a baixas temperaturas, esse intervalo pode ser ampliado para valores entre 4 e 10 (ADAMS, 1959 citado por HUDSON et al., 2005).

Na investigação de *Salmonella* em frutas frescas, usando o biocontrole com fagos (LEVERENTZ et al., 2001), foi indicado que a estabilidade dos fagos dependia do pH. Quando fagos foram incubados após ajuste de pH para 4,2, o seu número foi quatro vezes menor do que o daqueles em preparações ajustadas para pH 5,8 após 48h a 5 °C.

Misturas de fagos específicos de *L. monocytogenes* controlaram o número de células bacterianas em cortes de melão fresco, mas o efeito em maçãs artificialmente contaminadas não pôde ser demonstrado (LEVERENTZ et al., 2003). Segundo esses autores, o número de fagos nas amostras de melão encontrava-se estável, mas aquele observado nas fatias de maçãs rapidamente diminuiu, possivelmente devido ao baixo pH. Quando aplicada ao melão, a mistura de fagos resultou em redução imediata de cerca de dois ciclos logarítmicos nos números de *L. monocytogenes* e continuou a inibir o crescimento em até dois dias a 10 °C. Aos sete dias de armazenamento, observou-se uma diferença de mais de quatro ciclos logarítmicos nos números de *L. monocytogenes*, quando comparados às amostras não-tratadas. Em maçãs, essa diferença foi inferior a 0,4 log.

*Luz visível e ultravioleta:* Evidências mostram que para a maioria dos fagos, quando expostos à luz ultravioleta, há uma inativação exponencial (ADAMS, 1959 citado por HUDSON et al., 2005). A maior parte dos efeitos inativadores parece ser devido aos danos acumulados nos ácidos nucléicos. Em sistemas aquáticos, a

luz solar (em especial UV-B) parece ser o principal fator no declínio do número de fagos (SINTON et al., 2002; WOMMACK et al., 1996). Em laboratório, observou-se que os fagos irradiados com UV podem ser reativados após a reparação de seus ácidos nucléicos por vias de reparação luz-dependente das células-hospedeiras ou, em casos de infecção múltipla, por recombinação entre diferentes clones (ADAMS, 1959 citado por HUDSON et al., 2005).

*Sanitizantes:* Quiberoni, Suarez e Reinheimer (1999) demonstraram que o hipoclorito de sódio (100 ppm de cloro livre) e o ácido peracético inativam fagos do leite dentro de 5 a 10 minutos. O uso de etanol a 75% (v/v) foi efetivo contra fagos, enquanto o isopropanol não foi tão eficaz. Como os fagos são em geral mais capazes de resistir às mudanças ambientais do processamento de alimentos que as bactérias, eles podem persistir em locais que não sejam limpos e sanitizados corretamente (KENNEDY; BITTON, 1987).

### 6.1.3 Uso do Bacteriófago P100 para Controle de *Listeria monocytogenes*

A *L. monocytogenes* apresenta a particularidade de colonizar as instalações físicas e, portanto, pode contaminar os alimentos muito tempo depois do processo de produção, nas etapas de fermentação, processamento, armazenamento ou mesmo na embalagem (MEREGHETTI et al., 2000).

A atividade germicida dos sanitizantes depende de vários fatores, como concentração, tempo, temperatura, pH, solubilidade, concentração de matéria orgânica, tipo de superfície, espécie e população do microrganismo que se quer destruir (BEUCHAT et al., 2001). Embora os tratamentos com sanitizantes tenham demonstrado algum grau de eficácia no tocante à redução da população bacteriana, cada um deles apresenta desvantagens, como perda da estabilidade, alto grau de reatividade, riscos à saúde, questionamento pelos consumidores com relação à segurança do produto, alto custo ou mudanças sensoriais adversas, limitando, com isso, o seu uso (CAPITA et al., 2001).

A resistência natural de *L. monocytogenes* a muitos dos sistemas de controle do patógeno em alimentos, tem incentivado pesquisas para o desenvolvimento de métodos mais eficazes. Assim, é lógica a utilização do

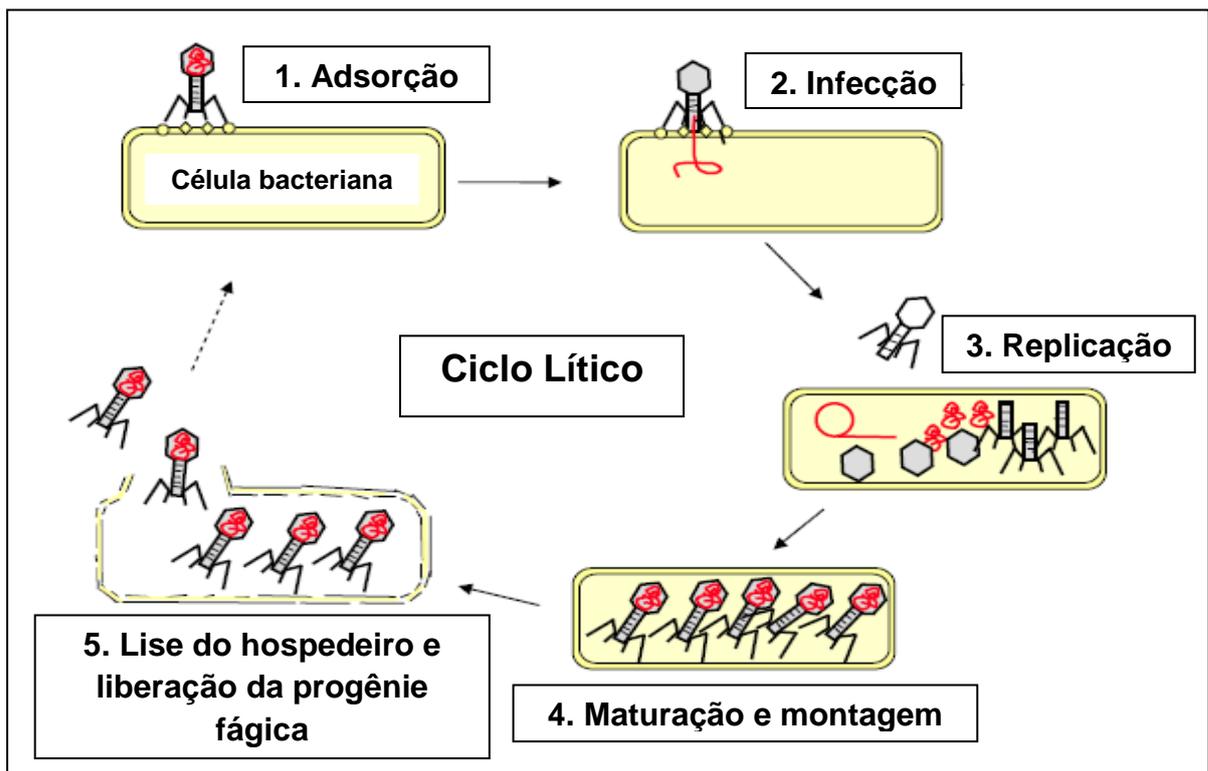
tratamento com bacteriófagos na etapa onde surge a contaminação. Para muitos alimentos, este seria um ponto antes da embalagem, mas o queijo, por exemplo, pode ser vulnerável a contaminação durante a fase de maturação. O bacteriófago para o combate desta bactéria pode ser introduzido nos alimentos prontos, nas embalagens (antes ou depois do produto já estar embalado); nas superfícies onde os alimentos são processados (utensílios, equipamentos, e até mesmo na estrutura física – chão, parede, teto); e, também, em dispositivos usados para armazenamento e transporte dos insumos (LEVERENTZ et al., 2004).

Em 2006, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e a agência norte-americana Food and Drug Administration (FDA) aprovaram o uso de bacteriófago específico para o controle de *Listeria* em queijos. O LISTEX™P100 é uma cultura de microrganismos seguros, composta de seis bacteriófagos específicos para o patógeno em questão, que pode ser usada na produção de alimentos como um aditivo natural do processo. Um ano depois, em 2007, essa aprovação se estendeu a todos os tipos de alimentos. Em novembro deste mesmo ano, o LISTEX ganhou um prêmio de ouro na Europa como ingrediente alimentar por ser a melhor inovação na indústria (EBI FOOD SAFETY, 2007).

Quase todos os fagos que infectam organismos do gênero *Listeria* são temperados e apresentam uma escala muito estreita do hospedeiro (LOESSNER; REES, 2005). O bacteriófago P100 representa um dos poucos fagos virulentos conhecidos para esse gênero, é estritamente lítico e, portanto, invariavelmente letal à célula bacteriana, uma vez que a infecção for estabelecida. Na Figura 4 é demonstrada uma visão esquemática do ciclo lítico. Além disso, P100 apresenta uma escala raramente larga do hospedeiro dentro do gênero *Listeria*, similar ao fago A511 (LOESSNER, 1991 citado por VAN DER MEE-MARQUET; LOESSNER; AUDURIER, 1997).

Estudo desenvolvido por Carlton et al. (2005), com base na otimização de testes preliminares, utilizou o bacteriófago P100 durante a fase de produção/maturação da superfície artificialmente contaminada de queijo macio. Dependendo dos pontos, da frequência e da dose de aplicações do fago, obteve-se redução significativa (pelo menos 3,5 logs) ou uma completa erradicação de células viáveis de *Listeria*. Não foram encontradas evidências para resistência do fago em isolados de *Listeria* recuperados das amostras. Vale ressaltar que o fago não afetou significativamente a funcionalidade da microbiota natural no processo de

maturação, ou seja, não ocorreram mudanças aparentes no produto tratado, comparado ao controle, em termos de textura ou cor. Os resultados indicam que o P100 pode fornecer uma medida efetiva e segura para o controle da contaminação de *Listeria* em alimentos e equipamentos de produção. Nesse mesmo experimento, foi realizado um estudo de toxicidade em ratos e nenhuma alteração histopatológica, mortalidade ou morbidade relacionada ao fago em questão foi observada.



**FIGURA 4** – Visão esquemática dos passos que levam à liberação de uma progênie fágica de uma célula infectada. Adaptado de Hagens e Offerhaus (2008).

O sequenciamento completo do genoma do bacteriófago P100 também foi determinado e analisado por Carlton et al. (2005). Os autores não encontraram nenhuma similaridade com qualquer um dos 174 produtos dos genes preditos do P100 para qualquer toxina conhecida ou suspeita ou outro fator envolvido na regulação da virulência e/ou patogenicidade de *Listeria* ou outros organismos.

Ainda, com relação ao fago P100, os dados obtidos indicam que o seu uso como aditivo para biopreservação dos alimentos é esperado ser seguro aos consumidores, assim como para o meio ambiente.

## 6.2 ÁCIDOS ORGÂNICOS DE CADEIA CURTA E SEUS SAIS

Dentre os antimicrobianos utilizados em alimentos, merecem destaque os ácidos orgânicos, por possuírem maior solubilidade, baixa interferência no sabor e baixo nível de toxicidade (BELLAYER; SCHEUERMANN, 2004).

Os ácidos orgânicos são também denominados de ácidos carboxílicos, os quais contêm uma ou mais carboxilas em sua molécula, classificação na qual podem ser incluídos os aminoácidos e os ácidos graxos. Em geral, quando o termo ácido orgânico é empregado refere-se aos ácidos fracos, de cadeia curta (C1 – C7). Assim, os ácidos orgânicos de cadeia curta, tais como acético, benzóico, cítrico, propiônico e sórbico são muito utilizados como conservantes ou acidulantes na indústria alimentícia (BASF, 2001).

Os ácidos orgânicos são comumente encontrados na natureza como componentes normais de tecidos animais e vegetais. Além disso, são formados pela fermentação microbiana no trato intestinal, constituindo parte importante do suprimento energético dos animais hospedeiros. A atividade antimicrobiana dos ácidos fracos podem ser explicados por diversos mecanismos, incluindo redução do pH, propriedades bacteriostáticas e diversas propriedades metabólicas aniônicas dos ácidos orgânicos após dissociação (BELLAYER; SCHEUERMANN, 2004).

### 6.2.1 Mecanismos da Ação Antimicrobiana dos Ácidos Orgânicos

Os ácidos exercem sobre os microrganismos dois tipos de efeitos distintos, em primeiro lugar existe efeito antimicrobiano devido a acidez, ou seja, a redução do pH extracelular e, em segundo e mais importante na prática, o efeito antimicrobiano específico devido a sua forma não dissociada que permite a penetração do ácido através da parede celular do microrganismo (FERNANDES, 2006).

Todos os microrganismos têm um pH ótimo de crescimento e um intervalo de pH fora do qual é impossível sua multiplicação, isto refere-se ao pH do meio extracelular, já que o pH intracelular tem que estar necessariamente ao redor da neutralidade, mesmo para as bactérias acidófilas. Esta manutenção do pH é

conseguida por mecanismos de homeostase, e a diminuição de uma ou duas unidades equivale a um aumento de 10 a 100 vezes nas concentrações dos prótons que tem um efeito drástico sobre a multiplicação bacteriana. O pH abaixo de 7,0 desequilibra o gradiente de prótons, o que resulta na dissipação da força próton-motora suprimindo o sistema enzimático (síntese de ATP acoplada ao processo respiratório), o de transporte de nutrientes, a motilidade e o metabolismo anaeróbico que também encontra-se regulado pelo pH do meio (BASKETT, HENTGES, 1973; citados por ALAKOMI et al., 2000).

O mecanismo de ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos é baseado no potencial acidificante e sua capacidade de dissociação. O potencial acidificante está relacionado com a capacidade dos ácidos orgânicos em ceder prótons ( $H^+$ ), mais eficientemente ou não, em diferentes meios, o que quimicamente reflete o potencial de dissociação do ácido ( $pka$ ). Todo ácido tem um ou mais  $pka$ , e quanto mais fácil ele doa seu hidrogênio, mais forte ele é, e se possui mais de um  $pka$  significa a existência de mais um próton a ser trocado. Os ácidos orgânicos podem se apresentar em duas formas: não dissociada ( $RCOOH$ ) ou dissociada ( $COOH^-$ ) e esse equilíbrio é medido pelo  $pka$ , que indica o pH, no qual 50% da molécula se encontra na forma dissociada (FRANÇA, 2008).

Os ácidos lipofílicos fracos, como láctico, acético ou propiônico, são capazes de passar pela parede da membrana celular de microrganismos em seu estado não dissociado e se dissociarem no interior da célula, produzindo íons  $H^+$  que diminuem o pH intracelular da célula. Uma vez no interior da bactéria, na forma não dissociada, o ácido afeta diretamente o pH intracelular e as células reagem eliminando os prótons tentando manter o pH constante, e esse mecanismo faz com que o gasto energético seja maior a fim de manter seu equilíbrio osmótico, reduzindo assim o crescimento celular microbiano (BELLAVÉ; SCHEUERMANN, 2004).

A maior ou menor atividade inibitória da forma não dissociada depende da capacidade desta em atravessar a membrana plasmática e exterior da bactéria e por este motivo, moléculas de pequeno tamanho e caráter hidrofóbico são mais eficazes. O tipo de toxicidade se deverá aos efeitos dos ânions no interior da célula (RODRÍGUEZ-PALENZUELA, 2001). Existe uma íntima relação entre o pH do meio e a concentração dissociada do ácido, pois a concentração não dissociada do ácido fraco será maior em um pH inferior ao  $pKa$  correspondente, ou seja, quanto maior a constante de dissociação, maior a eficiência (VIEIRA et al., 2003).

Por sua vez, a porção aniônica ( $\text{RCOO}^-$ ) do ácido danifica a estrutura do DNA no nucleóide das células e, conseqüentemente, as bactérias não se dividem ou podem morrer. A porção catiônica liberada dos ácidos reduz o nível do pH da célula, obrigando a célula bacteriana a utilizar sua energia para liberar os prótons, levando a uma exaustão celular (LANGHOUT, 2001). Em leveduras, a ação destes conservantes é bem semelhante: poderia ocorrer em função da indução de um estresse energético, reduzindo a quantidade de energia disponível para o crescimento e outras funções da célula (BRACEY et al., 1998, citados por BRUL; COORTE, 1999).

Outra conseqüência negativa deste processo se deve ao aumento da rigidez celular. Ao produzir a dissociação do ácido no interior celular, a concentração interna de ânions aumenta. Este aumento desencadeia um mecanismo de compensação da carga elétrica que obriga a bactéria a aumentar os níveis de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e/ou glutamato, que leva ao aumento da força iônica celular e da rigidez provocando o aumento da pressão mecânica sobre a parede do microrganismo, fazendo com que ele eventualmente lise (RODRÍGUEZ-PALENZUELA, 2001).

Outros mecanismos são sugeridos para a atividade antimicrobiana dos ácidos, tais como diminuição da capacidade de aderência da bactéria com fimbria à parede, tendo ainda forte capacidade de desnaturação sobre as proteínas e capacidade de quelação (BELLAVIER; SCHEUERMANN, 2004), além de tornarem-se um potencializador dos efeitos de outras substâncias antimicrobianas (ALAKOMI et al., 2000). As bactérias Gram negativas são as mais susceptíveis a ação dos ácidos com menos de oito carbonos e Gram positivas apresentam sensibilidade aos ácidos com cadeias maiores e moléculas mais lipolíticas (VIEIRA et al., 2003; FERNANDES, 2006).

Portanto, para melhor eficiência destes mecanismos e eficiência do poder bacteriostático/bactericida, os ácidos de baixo peso molecular, relação  $\text{pKa/pH}$  fisiológico e de cadeia curta, apresentam vantagens sobre os outros quando doses adequadas são utilizadas. O ácido acético possui 60g/ mol e  $\text{pKa}$  4,75 e dois carbonos em sua fórmula (VIEIRA et al., 2003; FERNANDES, 2006).

## 6.2.2 Uso de Ácidos Orgânicos e Seus Sais em Alimentos

A acidificação de alimentos com ácidos orgânicos de cadeia curta, por fermentação ou apenas pela adição intencional, é um mecanismo importante para controlar microrganismos patogênicos em alimentos como *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp. e *Salmonella* sp. No caso da *L. monocytogenes*, a resistência natural a muitos dos sistemas de preservação de alimentos, tem despertado a atenção e incentivado as pesquisas para o desenvolvimento de sistemas mais efetivos para o controle da bactéria (OH; MARSHALL, 1993, citados por BARKER; PARK, 2001).

Entretanto, vários estudos têm demonstrado que *L. monocytogenes* é mais ácido tolerante do que a maioria dos outros patógenos. Uma consideração relevante para a sobrevivência deste patógeno em alimentos é o fato de que a tolerância a ácidos pode ser alcançada pela exposição do microrganismo a condições moderadas de acidez, um fator que pode futuramente reduzir a efetividade dos sistemas de preservação baseados na acidez contra *L. monocytogenes* (DAVIS et al., 1996, citados por BARKER; PARK, 2001).

A atividade antimicrobiana do lactato de sódio e acetato de sódio é bem documentada, mais existem poucas informações sobre o efeito da combinação dessas duas substâncias na sobrevivência e crescimento de *L. monocytogenes* e *Salmonella* em alimentos. A taxa de crescimento de *L. monocytogenes* em soluções contendo lactato de sódio depende principalmente da atividade de água do produto, temperatura de armazenamento e em menor extensão da quantidade de nitrito no produto (MBANDI; SHELEF, 2001).

O lactato de sódio também é mencionado como um aditivo para diminuição da atividade de água. Um efeito adicional inibitório dos sais de lactato tem sido muito bem demonstrado (BLOM et al., 1997). Além disso, a atividade antimicrobiana dos sais de sódio e de outros ácidos orgânicos de cadeia curta, como o ácido cítrico, ácido acético e combinações dos seus sais tem sido relatada. Todas essas substâncias são geralmente reconhecidas como seguras “GRAS” (Substâncias Reconhecidas como Geralmente Seguras) pelo Código Federal de Regulamentações dos Estados Unidos. Entretanto, estudos publicados sobre atividade antimicrobiana dessas substâncias sobre *L. monocytogenes* em queijos são limitados (BUCHAMAN, 1990).

Golden, Buchanan e Whiting (1995) conduziram um estudo para avaliar a eficácia das misturas de acetato de sódio - EDTA, ácido ascórbico e propionato de sódio - EDTA, na inativação de *L. monocytogenes*. A avaliação dos compostos individualmente e em combinação indicou que os componentes agiram amplamente de uma forma aditiva. Os resultados também revelaram que a combinação de ácidos orgânicos primários e secundários e EDTA pode ser vantajosa na inativação de *L. monocytogenes* nos alimentos, e por outro lado evita os efeitos organolépticos associados ao uso excessivo de ácidos individuais.

A efetividade de um tratamento consistindo da adição de ácido láctico a 4% por aspensão (55 °C), em carcaças de frango resfriadas para reduzir a população bacteriana, foi testada por Castillo et al. (2001) em um abatedouro industrial. Os autores conseguiram reduzir a contagem em placas de aeróbios mesófilos, coliformes totais e *Escherichia coli* e concluíram que a aspensão do ácido láctico quente em concentração e tempo de aplicação aumentados pode ser usada com bons resultados para a descontaminação de carcaças de aves resfriadas antes do processamento.

Em pesquisa realizada com embutidos e presunto cozidos adicionados em diferentes concentrações de lactatos e acetatos e embalados à vácuo, Blom et al. (1997) concluíram que a inibição do crescimento de *L. monocytogenes* ocorreu quando as concentrações foram de 2,5% de lactato e de 0,25% de acetato.

Em outro estudo, Schmidt e Leistner (1991), observaram que uma combinação de 90% de acetato de sódio, 8% de ácido cítrico e 2% de ácido ascórbico inibiu o crescimento de *L. monocytogenes* em carnes processadas, não afetando o pH ou qualidades sensoriais da carne.

Em um estudo conduzido por Stekelenburg et al. (2001), produtos de presunto cozido curado, foram produzidos de acordo com uma receita padrão para presunto cozido com o acréscimo de vários níveis de lactato de sódio, diacetato de sódio ou citrato de sódio tamponado. Eles foram comparados com um produto de presunto de referência com respeito a qualidade sensorial e crescimento de *Lactobacillus curvatus* e *Listeria monocytogenes*. Para isso uma parte dos produtos foi analisada sensorialmente diretamente após a preparação. A outra parte dos produtos de presunto cozido foi triturada e homogeneizada inoculada com *Lactobacilos curvatus* ( $10^1/g$ ) e *L. monocytogenes* ( $10^2/g$ ) e colocados em sacos plásticos de 60 g. Após embalagem a vácuo, os sacos foram estocados a 4 °C por

até 40 dias. Somente pequenas diferenças foram encontradas em relação a aparência, coloração interna, estrutura e firmeza. A adição de diacetato de sódio 0,2% teve um efeito negativo no odor e sabor do produto de presunto. Já a adição de lactato de sódio de 2,5 a 3,3% inibiu o crescimento de *L. curvatus* comparado a referência, enquanto o diacetato de sódio 0,1 e 0,2% não inibiu o crescimento. *L. monocytogenes* foi melhor inibida pela adição de lactato de sódio, mas também pela adição de diacetato de sódio a 0,2%. Por outro lado, o crescimento de *L. monocytogenes* foi estimulado pela adição de citrato de sódio tamponado.

Com o objetivo de aumentar a vida de prateleira de linguiças frescas, Rodrigues, Terra e Fries (2000) estudaram o emprego de lactato de sódio em diferentes concentrações e a adição de cultura "starter". As linguiças foram submetidas a diferentes tratamentos, nos quais foram adicionados 2%, 4% e 6% (p/v) de lactato de sódio e cultura "starter" Elce (1 envelope por 100 kg de massa). Foram realizadas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotrópicos e coliformes totais, logo após os tratamentos e durante o período de estocagem a 3 °C. As amostras de linguiças foram submetidas a um painel de degustadores para avaliação dos atributos cor, aroma, sabor e textura. As amostras tratadas com 2% de lactato de sódio apresentaram um aumento de 3 dias na vida útil das linguiças e em média não diferiram do controle quanto as características sensoriais. As amostras tratadas com 4% e 6% de lactato de sódio apresentaram contagens de microrganismos aeróbios mesofílicos, psicrotrópicos e coliformes totais menores do que o controle e prolongaram a vida de prateleira das linguiças para 33 dias de armazenamento. As características sensoriais melhoraram significativamente ( $P < 0,05$ ), sendo que o tratamento com 4% de lactato de sódio foi o preferido pelos painelistas. Pelos resultados apresentados, os autores afirmaram que é viável o emprego de aditivos naturais contendo 4% de lactato de sódio, visando aumentar a vida útil das linguiças frescas, pois o uso deste conservante, além de não afetar as características sensoriais do produto, prolonga a sua vida de prateleira com maior segurança para o consumidor.

Em relação ao ácido propiônico e seus sais, estes são bastante utilizados na nutrição animal, principalmente para preservação de alimentos, reduzindo pH e criando um ambiente desfavorável aos microorganismos pelo comprometimento do seu metabolismo e, adicionalmente, estes apresentam algum efeito nutricional (BASF, 2001).

O ácido propiônico é particularmente eficiente na conservação de matérias primas e alimentos balanceados pela sua excelente ação antifúngica. Este ácido pode também ser utilizado eficientemente no controle de *Salmonella* (BASF, 2003).

No intuito de avaliar a ação antimicrobiana *in vitro* de propionato de sódio sobre leveduras isoladas de ricotas, Carnicel et al. (2005) utilizaram placas de Petri com Ágar sabouraud dextrose (pH ajustado para 5,1) acrescentado das seguintes concentrações do conservante (0= controle; 0,1; 0,15; 0,2;0,3; 0,4; 0,6%; onde foram semeadas culturas previamente crescidas em caldo sabouraud dextrose com pH = 5,1. Após 21 dias de incubação a 25 °C, os autores verificaram que 1,1% das leveduras testadas foram sensíveis ao propionato de sódio, a partir da concentração de 0,1%, ao passo que 4,5% foram inibidas quando as concentrações de 0,15 a 0,6% foram empregadas..

É importante lembrar que as bactérias experimentam diferentes tipos de estresse em sua vida diária e podem se adaptar a esta nova condição. O fenômeno de tolerância induzida ao estresse ácido foi descoberto inicialmente em linhagens de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp, mas depois generalizou-se para muitas outras bactérias Gram negativas e Gram positivas (RODRÍGUEZ-PALENZUELA, 2001).

O mecanismo de adaptação se deve ao crescimento em pH moderadamente ácido induzir a síntese de proteínas específicas, as quais protegem as células dos pHs extremamente ácidos. Existem diferentes sistemas implicados, dependendo da fase de crescimento, meio de cultura e tipo de estresse ácido. O conhecimento deste mecanismo de adaptação não é bem conhecido e até agora o que se deduz é que a redução do pH extracelular acaba provocando uma diminuição do pH intracelular. Este pH intracelular ativa a expressão de genes que codificam as descarboxilases dos aminoácidos e estas enzimas podem elevar o pH interno, já que catalisam reações que consomem prótons. São descritas três reações de descarboxilação associadas a este fenômeno: glutamato a GABA (Ácido gama-aminobutírico), arginina a agmatina e lisina a cadaverina. Naturalmente, este mecanismo resulta em grande gasto energético para a célula. Além disso, a redução do pH intracelular produz a acumulação de duas proteínas reguladoras importantes RpoS e PhoP, que controlam diferentes conjuntos de genes que estão relacionados a proteção e reparação de macromoléculas (RODRÍGUEZ-PALENZUELA, 2001).

## REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, H. W.; GREER, G. G.; ROCOURT, J. Morphology of *Brochothrix thermosphacta* phages. **Microbios**, v. 56, p. 19-26, 1988.
- ADAMS, M. H. Bacteriophages. New York: **Interscience Publishers**, 1959.
- ALAKOMI H. I.; SKYTTÄ, E.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; LATVA-KALA, K.; HELANDER, I. M. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2001-2005, 2000.
- ALMEIDA, P.F; ALMEIDA, R.C. C.; RODRICK, G.E. *Listeria monocytogenes*: importância e distribuição nos alimentos. **Higiene Alimentar**, v.17, p.19-23, 1999.
- ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C. A PCR protocol using inl gene as a target for specific detection of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 11, p. 97-101, 2000.
- ATTERBURY, R. J.; VAN BERGEN, M. A.; ORTIZ, F.; LOVELL, M. A.; HARRIS, J. A.; DE BOER, A.; WAGENAAR, J. A.; ALLEN, V. M.; BARROW, P. A. Bacteriophage therapy to reduce *salmonella* colonization of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 4543, 2007.
- BACKER, M.; BRETT, M.; SHORT, P. Listeriosis and mussels. **Commun. Disease New Zealand**, v. 93, p. 13-14, 1993.
- BARKER, C.; PARK, S. F. Sensitization of *Listeria monocytogenes* to low pH, organic acids and osmotic stress by ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n.4, p. 1594-1600, 2001.
- BASF. Nutrição Animal. **Compound Feed Preservation**. 2001.
- BASF. Nutrição Animal. **Technical Information. Products for the Feed Industry**. 2003.
- BEAUREGARD, K. E.; LEE, K. D.; COLLIER, R. J.; SWANSON, J. A. pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. **Journal of Experimental Medicine**, v.186, n.7, p.1159-1163, 1997.
- BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte. **III Seminário Internacional de Aves e Suínos**, Florianópolis, SC, 2004.
- BERCHIERI Jr., A.; LOVELL, M. A.; BARROW, P. A. The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. **Research in Microbiology**, v. 142, p. 541-549, 1991.

BERESFORD, M. R.; ANDREW, P. W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.1000-1005, 2001.

BERNHARDT, T. G., WANG I. N.; STRUCK D. K.; YOUNG R. Breaking free: “protein antibiotics” and phage lysis. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 8, p. 493–501, 2002.

BEUCHAT, L. R.; FARBER, J. M.; GARRET, E. H.; HARRIS, L. J.; PARISH, M. E.; SUSLOW, T. V.; BUSTA, F. F. Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 1079-1084, 2001.

BEUMER, R. R.; HAZELEGER, W. C. *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. **Immunol Med Microbiol.**, v. 35, p. 191-197, 2003.

BILLE, J.; ROCOURT, J.; SWAMINATHAN, B. *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**, v.1, p.461- 471, 2003.

BINETTI, A. G.; REINHEIMER, J. A. Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 509-515, 2000.

BLOM, H.; NERBRINK, E.; DAINTY, R.; HAGTVEDT, T.; BORCH, E.; NISSEN, H.; NESBAKKEN, T. Addition of 2,5% lactate and 0,25% acetate controls growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, sensory-acceptable serelat sausage and cooked ham stored at 4°C. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, p.71-76, 1997.

BORGES, M. F.; ANDRADE, A. P. C.; ARCURI, E. F.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza, 2009.

BRANCO, M. A. A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES, M. F.; SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 393-408, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 7 – E, 10 de janeiro de 2001.

BREITBART, M., HEWSON, I.; FELTS, B.; MAHAFFY, J. M.; NULTON, J.; SALAMON, P.; ROHWER, F. Metagenomic analysis of an uncultured viral community from human feces. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 6220-6223, 2003.

BRITO, J. R.; SANTOS, E. M. P.; ARCURI, E. F.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; SOUZA, G. N.; CERQUEIRA, M. M. P. O.; BELTRAN, J. M. S.; CALL, J. E.; LIU, Y.;

PORTO-FETT, A. C. S.; LUCHANSKY, J. B. Retail survey of Brazilian milk and Minas Frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 74, n.15, p. 4954-4961, 2008.

BRUL, S.; COORTE, P. Preservative agents in foods mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1-2, p. 1-17, 1999.

BRUTTIN, A., BRUSSOW, H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 2874 - 2878, 2005.

BUCHANAN, R. L. Advances in cultural methods for the detection of *Listeria monocytogenes*. In: MILLER, A. (ed.). **Foodborne listeriosis**. New York: Elsevier, p. 85-95, 1990.

BÜLA, C. J.; BILLE, J.; GLAUSER, M. P. An epidemic of food-borne listeriosis in Western Switzerland: decryption of 57 cases involving adults. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 20, n. 1 , p. 66-72, 1995.

CABANES, D.; DEHOUX, P.; DUSSURGET, O.; FRAGEU, L.; COSSART, P. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, v.10, n.5, p.238-245, 2002.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; GARCIA-FERNANDEZ, C.; MORENO, B. Efficacy of trisodium phosphate solutions in reducing *L. monocytogenes* populations on chicken skin during refrigerated storage. **Journal of Food Protection**, v. 64, n.10, p. 1627-1630, 2001.

CARLTON, R.M.; NOORDMAN, W.H.; BISWAS, B.; MEESTER, E.D.; LOESSNER, M.J. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 43, p. 301–312, 2005.

CARNICEL, F. A.; PERESI, J. T. M.; COELHO, A. R.; GONÇALVES, T. M. V.; HOFFMANN, F. L. Avaliação da ação antimicrobiana *in vitro* de propionato de sódio sobre leveduras isoladas de ricotas. **Higiene Alimentar**; v. 19, n. 129, p. 76-81, 2005.

CARRIQUE-MAS, J. J.; HÖKEBERG, I.; ANDERSON, Y.; ARNEBORN, M.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M.-L.; OSTERMAN, B.; LEFFFLER, M.; STEEN, M.; ERIKSSON, E.; HEDIN, G.; GIESECKLE, J. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese – an outbreak of listeriosis? **Epidemiology and Infection**, London, v. 130, n.1, p. 79-86, 2003.

CASTILLO, A.; LUCIA, L. M.; MERCADO, I.; ACUFF, G.R. In-plant evaluation of a lactic acid treatment for reduction of bacteria on chilled beef carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 64, n.5, p. 738-740, 2001.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy – Massachusetts, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Reports**, Atlanta, v. 57, n. 40, p.1097-1100, 2008.

COLODNER, R.; SAKRAN, W.; MIRON, D.; TEITLER, N.; KHAVALEVSKY, E.; KOPELOWITZ, J.B. *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a nursery. **American Journal of Infectious Control**, v.31, n.5, p.322-324, 2003.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, p. 367-373. 1992.

COSSART, P. Actin-based bacterial motility. **Current Opinion in Cell Biology**, v.7, n.1, p.94-101, 1995.

CRESPO, M. P.; VÉLEZ, J. D.; CASTAÑEDA, C.; HOYOS, F.; LÓPEZ, M. L.; SALAZAR, J. C. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en um hospital de tercer nivel. **Colombia Médica**, v.30, n.2, p.89-98, 1999.

DENDER, A. G. F. V. *Listeria monocytogenes*: um problema em leite e produtos lácteos. **Informe Agropecuário**, v. 13, p. 19-23, 1988.

DEVLIEGHIERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 14, p. 273-285, 2004.

DiMAIO, H. *Listeria* infection in women. Elsevier Science Inc. – **Honorable Mention**, v.7, n.1, p. 40-46, 2000.

DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition Reviews**, v. 59, p.183-194, 2001.

DOROZYNSKI, A. Seven dye in French *Listeria* outbreak. **Britain Medical Journal**, v. 320, p. 601, 2000.

DOYLE, M. P. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, v. 42, p. 169-171, 1988.

DOYLE, M. P.; MESKE, L. M.; MARTH, E. H. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufactory and storage of non fat dry milk. **Journal of Food Protection**, v.48, n.9, p. 740-742, 1985.

DRAMSI, S.; COSSART, P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biology**, v.14, p.137-166, 1998.

DUARTE, D. A. M.; SCHUCH, D. M. T.; SANTOS, S. B.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SILVA, J. V. D.; MOTA, R. A. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no Estado do Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297-302, 2005.

EBI FOOD SAFETY. **FDA and USDA extend GRAS approval for LISTEX™ for all food product.** News July 2007, Disponível em: <http://www.ebifoodssafety.com/en/news-2007.aspx>. Acesso em Dezembro de 2009.

ELLIS, D. E.; WHITMAN, P. A.; MARSHALL, R. T. Effects of homologous bacteriophage on growth of *Pseudomonas fragi* wy in milk. **Applied Microbiology**, v. 25, p. 24-25, 1973.

EMOND, E.; FLISS, I.; PANDIAN, S. A ribossomal DNA fragment of *Listeria monocytogenes* and its use as a genus-specific probe in aqueous-phase hybridization assay. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2690-7, 1993.

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

FDA/ CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION; USDA/ FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Draft Assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods.** Disponível em: <http://www.foodsafety.gov/> e <http://www.cfsan.fda.gov/>, acessados em Agosto de 2009.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênic-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 23, p.162-165, 2003.

FERNANDES H. G. **Acidificantes**, 2006. Disponível em: <http://www.vaccinar.com.br/artigos3.htm>. Acesso em Outubro de 2010.

FIGUEIREDO, E. A. T. **Ocorrência do gênero *Listeria* e avaliação da diversidade genética de *Listeria monocytogenes* através do random amplified polymorphic DNA (RAPD) e sua distribuição em uma linha de processamento de leite pasteurizado tipo C.** São Paulo. 2000. 100p.Tese (Doutor em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2000.

FIORENTIN, L., VIEIRA, N. D., BARIONI, W., Jr. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella Enteritidis* PT4 in caecal content of broilers. **Avian Pathology**, v. 34, p. 258 - 263. 2005.

FLEMING, D. W.; COCHI, S. L.; MACDONALD, K. L.; BRONDUN, J.; HAYES. P. S.; PLIKAYTIS, B. D.; HOIMES, M. B.; AUDURIER. A.; BROOME, C. V.; REINGOLD, A. L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **New England Journal of Medicine, Boston**, v. 312, n. 7, p. 404-407, 1985.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu; 2005. 182p.

FRANÇA, M. I. **Uso de formiato de sódio e potássio em rações para frangos.** Dissertação (Mestrado). Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2008. 53f.

GAENG, S.; SCHERER, S.; NEVE, H.; LOESSNER, M. J. Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2951-2958, 2000.

GAILLARD, J. L. et al. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. **Cell**, v.65, n.7, p.1127-1141, 1991.

GAULIN, C.; RAMSAY, D.; RINGUETTE, L.; ISMAIL, J. **First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002.** Canada Communicable Disease Report, Quebec, v. 29, n. 21, Nov. 2003. Disponível em: [hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/ccdr-/03vol29/dr2921ea.html](http://hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/ccdr-/03vol29/dr2921ea.html). Acesso em Março de 2010.

GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L.; KAMEI, C. A. K.; ABREU, E. S.; RIBEIRO, E. R.; SILVA, K. C. et al. Manipuladores de alimentos: capacitar? É preciso. Regulamentar? Será Preciso ? **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 78/79, p. 18-22, 2000.

GERMANO. M. I .S.; GERMANO, P. M. L. **Higiene e Vigilância Sanitária de alimentos.** São Paulo: Varela, 2001.

GIANFRANCESCHI, M.; GATTUSO, A.; TARTARO, S.; AURELI, P. Incidence of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples in Italy between 1990 and 1999: serotype distribution in food, environmental and clinical samples. **European Journal Epidemiology**, Amsterdam, v. 18, n. 10, p. 1001-1006, 2003.

GITTER, M.; BRADLEY,R.; BLAMPIED, P.A. *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. **Veterinary Record**, v.107, n. 17, p.390-393, 1980.

GOLDBERG, E. L.; GRIUIUS, L.; LETELLIER, L. Recognition, attachment, and injection. *In*: KARAM, J. D. (Ed.). **Molecular biology of bacteriophage T4.** Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 347-356. 1994.

GOLDEN, M. R.; BUCHANAN, R. L.; WHITING, R. C. Effect of sodium acetate or sodium propionate with EDTA and ascorbic acid on the inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Safety**, v.15, n. 53-65, 1995.

GOODE, D., ALLEN, V.M., BARROW, P.A. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5032, 2003.

GOULET, V.; JAQUET, C.; VAILLANT, V.; REBIÉRE, I.; MOURET, E.; LORENTE, C.; MAILLOT, E.; STAINER, F. ROCOURT, J. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. **The Lancet**, London, v. 345, n. 8964, p. 1581-1582, 1995.

GREER, G. G. Homologous bacteriophage control of *Pseudomonas* growth and beef spoilage. **Journal of Food Protection**, v. 49, p. 104-109, 1986.

GREER, G. G. Effect of phage concentration, bacterial density, and temperature on phage control of beef spoilage. **Journal of Food Science.**, v. 53, p. 1226-1227, 1988.

GREER, G. G.; DILTS, B. D. Inability of a bacteriophage pool to control beef spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, p. 331-342, 1990.

GUERRA, N.P.; ARAUJO, A. B.; BARRERA, A. M.; AGRASAR, A.T.; MACIAS, C.L.; CARBALLO, J.; PASTRANA, L. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to surfaces commonly used in the food industry. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 1012-1019, 2005.

HAGENS, S.; OFFERHAUS, M. L. Bacteriophages – New weapons for foods safety. **Food Technology**, v. 62, n. 4, p. 46-54, 2008.

HANLON, G. W. Bacteriophage: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 118-128. 2007.

HILBERT, L. R.; BAGGE-RAVN, D.; KOLD, J.; GRAM, L. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p. 175-185, 2003.

HOF, H.; LAMPIDIS, R. Retrospective evidence for nosocomial *Listeria* infection. **Journal of Hospital Infection**, v.48, p.321-322, 2001.

HOF, H.; NICTERLEIN, T.; KRETSCHMAR, M. Management of Listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, n.2, p.345-357, 1997.

HOFER, E. Species and sorovares of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 615-620, 2000.

HOFER, E. Três decênios de experiência sobre *Listeria* no Brasil. In : MERCADANTE, A. Z.; BOBBIO, F.O; BOBBIO P. A.; PEREIRA, J. L., PASTORE, G.M. (Eds). **Ciência de Alimentos - avanços e perspectivas**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, vol. II, p.111-115, 2001.

HOFER, E.; REIS, C.M.F. Species and serovars of *Listeria* isolated from sick and clinically healthy animals in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 79-83, 2005.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, p. 9-18, 1995.

HUDSON, J. A.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; GREENING, G. Bacteriophages as biocontrol agents in food. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 426-437, 2005.

IRETON, K.; COSSART, P. Interaction of invasive bacteria with host signaling pathways. **Current Opin in Cell Biology**, v.10, n.2, p.276-283, 1998.

JAY, J. M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**, v. 7, n. 4/5, p. 209-214, 1996.

JAY, J.M. Foodborne Listeriosis. *In*: **Modern Food Microbiology**, 6<sup>a</sup>. ed, 2000.

JAY, J. M. Introdução aos microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. *In*: JAY, J. M. (Ed). **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JENSEN, N. E.; AARESTRUP, F. M.; JENSEN, J.; WEGENER, H. C. *Listeria monocytogenes* in bovine mastitis. Possible implication for human health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 32, p.209-216, 1996.

JOERGER, R. D. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. **Poultry Science**, v. 82, p. 640-647, 2003.

JONQUIERES, R. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. **Molecular Microbiology**, v.34, n.5, p.902-914, Dec. 1999.

KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. 9, p. 2803-2812, 2004.

KASNOWSKI, M. C. ***Listeria* spp., *Escherichia coli*: Isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída**. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária – Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, 2004. 111f.

KELLS, J.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood ágar for isolation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2 p. 167-174, 2004.

KENNEDY, J. E. J.; BITTON, G. Bacteriophages in foods. *In*: GOYAL, S. M.; GERBA, C.P.; BITTON, G. (Eds). **Phage ecology**. New York: John Wiley & Sons, p. 289-316, 1987.

KEER, K. G. Materno-fetal listeriosis from cook-chill and refrigerated foods. **Lancet**, v. 2, n. 1133, p. 11-13, 1988.

KOSTRZYNSKA, M.; CAMPOS, M. C.; GLIFFITHS, M.; LEPP, D. Biocontrol of Salmonella entérica serovar Typhimurium DT104 on poultry products using

bacteriophages. *In: AGRICULTURE AND AGRI-FOOD CANADA FOOD NETWORK MEETING*, Lacombe, Alberta, Canada, 2002. p. 35. Lacombe: 2002.

LACIAR, A.L.; HASUOKA, R.P.; CORREA, S.M.; MIRANDA, A.M.; CENTORBI, O.N.P. Symptomatic hydrocephalus in a newborn infected with *Listeria monocytogenes*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.9-11, 2000.

LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: a visão da indústria e recentes avanços. *In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas*. Campinas: FACTA. P. 181-190, 2001.

LEITE, C. C., GUIMARÃES, A. G., RIBEIRO, N. S., SILVA, M. D., ASSIS, P. N. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em queijo do tipo "Coalho" comercializado em Salvador (BA). Importância para a Saúde Pública. **Revista Analytica**, Novembro, n. 02, p. 38-41, 2002.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.S.; ALAVIDZE Z.; JANISIEWICZ W.J.; FUCHS Y.; CAMP M.J.; CHIGHLADZE, E.; SULAKVELIDZE, A. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 1116-1121, 2001.

LEVERENTZ, B. CONWAY, W. S.; CAMP, M. J.; JANISIEWICZ, W. J.; ABULADZE, T.; YANG, M.; SAFTNER, R.; SULAKVELIDZE, A. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and bacteriocin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4519-4526, 2003.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W. S.; JANISIEWICZ, W.; CAMP, M. J. Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1682, 2004.

LIMA, M. H. P. **Elaboração de queijo de coalho a partir de leite pasteurizado e inoculado com *S. thermophilus* e *L. bulgaricus***. Fortaleza, 1996. 82 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.

LIN, C.M.; TAKEUCHI, K.; ZHANG, L.; DOHM, C.B.; MEYER, J.D.; HALL, P. A.; DOYLE, M. P. Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 71-79, 2006.

LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; LOU, X. D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C.; YONEKURA, M. L.; HAYES, P.; WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLIKAYTIS, B. D.; FANNIN, S. L.; KLEKS, A.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **New England Journal of Medicine**, v. 319, p. 823-828, 1988.

LOESSNER, M. J.; REES, C.E.D. *Listeria* phages: basics and applications. *In: WALDOR, M.K.; FRIEDMANN, D.I.; ADHYA, S. L. (Eds.). Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*. Washington, DC.: American Society for Microbiology, 2005.

LOGUERCIO, A. P.; SILVIA, W. P.; ALEIXO, J. A. G.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n. 80/81, p.39-48, 2001.

LOVETT, J. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P. (Ed). **Food-borne pathogens**. New York: Marcel Dekker, p. 283-310. 1989.

LUNDÉN, J.M.; AUTIO, T.J.; KORKEALA, H.J. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1129-1133, 2002.

LUNDÉN, J. M.; AUTIO, T. J.; KORKEALA, H. J. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, p. 6-11, 2004.

LYYTIKÄINEN, O.; AUTIO, T.; MAIJALA, R.; RUUTU, P.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; MIETTINEN, M.; HATAKKA, M.; MIKKOLA, J.; ANTTILA, V. J.; JOHANSSON, T.; RANTALA, L.; AALTO, T.; KORKEALA, H.; SIITONEN, A. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a from butter in Finland. **The Journal Infectious Diseases**, Boston, v. 181, n. 5, p. 1838-1841, 2000.

MACDONALD, P. D. M.; WHITWAM, R. E.; BOGGS, J. D.; MACCORMACK, J. N.; ANDERSON, K. L.; REARDON, J. W.; SAAH, J. R.; GRAVES, L. M.; HUNTER, S. B.; SOBEL, J. Outbreak listeriosis among mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 40, n. 5, p. 677-682, 2005.

MAKINO, S. I.; KAWAMOTO, K.; TAKESHI, K.; OKADA, Y.; YAMASAKI, M.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 104, n. 2 p. 189-196, 2005.

MASCOLA, L.; SORVILLO, F.; NEAL, J.; IWAKOSHI, K.; WEAVER, R. Surveillance of listeriosis in Los Angeles country, 1985-1986. **Archive International of Medicine**, v. 149, p. 1569-1572, 1989.

MATSUZAKI, S., MOHAMMAD, R.; JUMPEI, U.; SHINGO, S.; TAKAKO, U.; MASAYUKI K., et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 11, p. 211-219. 2005.

MBANDI, E.; SHELEF, L. A. Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enderitidis in meat by combinations of sodium lactate and diacetate. **Journal of Food Protection**, v.64, n.5, p. 640-4, 2001.

McKELLAR, R. C. Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 4219-4225, 1994.

McLAUCHLIN, J. Human listeriosis in Britain, 1967-1985, a summary of 722 cases. *In: Listeriosis during pregnancy and in the newborn. Epidemiology Infect.*, v. 104, p. 181-189, 1991.

McLAUCHLIN, J. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. **Environmental Policy Prat.**, v. 3, p. 201-214, 1993.

McLAUCHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control**, v. 7, n.4/5, p.187-193, 1996.

McLAUCHLIN, J. The identification of *Listeria* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 77-81, 1997.

McLAUCHLIN, J.; GILBERT, R.J. *Listeria* in foods. **PHLS Microbiology**, v.7, p.54-55, 1990.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, v. 21, p. 213-216, 2004.

MENENDEZ, S.; GODINEZ, M. A. R.; RODRIGUEZ-OTERO, J. L.; CENTENO, J. A. Removal *Listeria* spp. in a cheese factory. **Journal Food Safety**, Trumbull, v. 17, n. 2, p. 133-139, 1997.

MEREGHETTI, L.; QUENTIN, R.; MAEQUET-VAN DER MEE, N.; AUDURIER, A. Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5083-5086, 2000.

MODI, R.; HIRVI, Y.; HIL, L. A.; GRIFFITHS, M. W. Effect of phage on survival of *Salmonella* Enteritidis during manufacture and storage of Cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 927-933, 2001.

NALDINI, M. C. M. **Comportamento diferencial de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborados pelo método convencional e por acidificação direta.** Campinas, 2002, 72p. Dissertação apresentada para Obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2002.

NICOLAS, J. A.; ESPAZE, E. P.; CATIMEL, B.; VIDAUD, D.; ROCOURT, J. M.; COURTIEU, A. L. Isolation of *Listeria* from French meat products. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 27, p. 242-247, 1989.

O'FLYNN, G.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COFFEEY, A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* 0157:H7. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3417-3421, 2004.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** 2ª ed. São Paulo, SP: Makron Books do Brasil: Pearson Education do Brasil, 1997.

- PEREIRA, M. L.; ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes* – uma revisão sobre os aspectos taxonômicos, importância médica e em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 7, p. 5-12, 1993.
- PINTADO, C. M. B. S.; OLIVEIRA, A.; PAMPULHA, M. E.; FERREIRA, M. A. S. S. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. **Food Microbiology**, Amsterdam v. 21, n. 2, p. 213-216, 2004.
- PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie (LWT)**, v. 38, p. 859-865, 2005.
- PRITCHARD, T. J.; FLANDERS, K. J.; DONNELLY, C. W. Comparison of incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 375-384, 1995.
- QUIBERONI, A.; SUAREZ, V. B.; REINHEIMER, J. A. Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 894-898, 1999.
- QUINN, P. J. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: ARTMED, 2005.
- RIJPENS, N.P.; JANNES, J.; VAN ASBROECK, M.; HERMAN, L.M.; ROSSAU, R. Simultaneous detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by reverse hybridization with 16S-23Sr RNA spacer probe. **Molecular and Cellular Probes**, v. 9, p. 423-32, 1995.
- ROCOURT, J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (Eds.) **Listeria, listeriosis and food safety**. 2<sup>a</sup> ed. p. 1-20. New York: Marcel Dekker, 1999.
- ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: **Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers**. DOYLE; BEAUCHAT; MONTVILLE, 1997.
- RODGERS, S. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures – A Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, p. 276-284, 2001.
- RODRIGUES, R. A.; TERRA, N. N.; FRIES, L. L. M. Lactato de sódio: um conservante natural no processamento de lingüiça frescal. **Higiene Alimentar**; v. 14, n. 75, p. 56-61, 2000.
- RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P. **Los ácidos orgánicos como agentes antimicrobianos**. XVI Curso de Especialización. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Madrid. FEDNA, 2001. Disponível: <http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/00CAP8.pdf#search=%22XVI%20CursC%20de%20Especializaci%C3%B3n%20FEDNA%20los%20%C3%A1cidos%22org%C3%A1nicos%22>. Acesso em novembro de 2010.

RØRVIK, LM; AASE, B; ALVESTAD, T; CAUGANT, DA. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in broilers and poultry products. **Letters in Applied Microbiology**, v. 94, n.4, p. 633-640, 2003.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. Eds. **Listeria, listeriosis and food safety**. 3rd edition, Taylor and Francis, Boca Raton, Florida, 2006.

SALAMANO, R.; BRASELLI, A.; HOPPE, A.; MONTEGHIRFO, R.; SILVA, T. Neurolisteriosis in adults: report of six clinical cases. **Arquivos de Neuro - Psiquiatria**, São Paulo, v. 63, n.4, p. 1063-1069, 2005.

SCHMIDT, K.; LEISTNER, E. Microbial production of (+) - trans-isochorismic acid. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 45, p. 285-291, 1991.

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, M.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology Review**, v.4, p.169-183, 1991.

SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (ed), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Williams e Wilkins, Baltimore, v.2, p.1234-1245, 1986.

SEELIGER, H.P.R.; LANGER, B. Serological analysis of the genus *Listeria* its value and limitations. **International Journal of Food Microbiology**, v.8, p. 245-248, 1989.

SHEEHAN, B. Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. **Curr. Top. Microbiology Immunology**, v.192, p.187-216, 1994.

SHENG, H.; KNECHT, H. J.; KUDVA, I. T.; HOVDE, C. J. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, p. 5359-5366, 2006.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 241-248, 2003.

SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 3, p. 354-356, 1998.

SILVA, M. C. D.; TIBANA, A. *Listeria monocytogenes* em alimentos: seu significado nos dias atuais. **Higiene alimentar**, v. 9, p. 7-10, 1995.

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

SILVA, N. JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3ª ed., São Paulo: Livraria Varela, 2007. 316p.

SILVA, W. P.; LIMA, A. S.; GANDRA, E. A.; ARAÚJO, M. R.; MACEDO, M. R. P.; DUVAL, E. H. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça fresca em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.3, p.911-916, 2004.

SIM, J.; HOOD, D.; FINNIE, L.; WILSON, M.; GRAHAN, C.; BRETT, M.; HUDSON, J.A. Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, p.409-413, 2002.

SINTON, L. W.; HALL, C. H.; LYNCH, P. A.; DAVIES-COLLEY, R. J. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from water stabilization pond effluent in fresh and saline waters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1122-1131, 2002.

SKYLAR, I. B.; JOERGER, R. D. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enteric* serovar Enteritidis infection in chickens. **Journal of Food Safety**, v. 21, p. 15-29, 2001.

SLADE, P.J. Monitoring *Listeria* in the food production environment. In: Detection of *Listeria* in processing plants and isolation methodology. **Food Research International**, v.25, p.45-56, 1992.

SOUSA, R. A.; FIGUEIREDO, E. A. T. de; MAIA, G. A.; FRIZZO, S. E. Incidência de *L. monocytogenes* em queijo tipo coalho artesanal comercializado à temperatura ambiente em Fortaleza-CE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 138, p.66-69, 2006.

STARBUCK, M. A. B.; HIL, P. T.; STEWART, G. S. A B. Ultrasensitive detection of *L. monocytogenes* in milk by the polymerase chain reaction trans PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 15, p. 248-52, 1992.

STEKELBURG, F. K. Effect of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sensory quality and development of a strain of *Lactobacillus curvatus* and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, n. 66, p. 197-203, 2001.

SULAKVELIDZE, A.; BARROW, P. Phage therapy in animals and agribusiness. In: KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. (Eds.) **Bacteriophages: Biology and applications**. Boca Raton: CRC Press, p. 335-380, 2005.

SUTHERLAND, P.; PORRIT, R. Dissemination and ecology of *Listeria monocytogenes* in Australia dairy factory environment. **Food**, Australia, Waterloo, v. 48, n. 4, p.172, 174-176, 178, 1996.

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. 2nd ed., chap. 18, p. 383-409. Washington D. C.: ASM, 2001.

TANJI, Y.; SHIMADA, T.; YOICHI, M.; MIYANAGA, K.; HORI, K.; UNNO, H. Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, p. 270-274, 2004.

THERIOT, J. A. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. **Nature**, v.357, n. 6375, p. 257-260, 1992.

TILNEY, L. G.; PORTNOY, D. A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. **Journal Cell Biology**, v.109, n.4 p.1597-1608, 1989.

USDA/FSIS. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples. In: **United States Department of Agriculture (USDA)/Food Safety and Inspection Service (FSIS), Microbiology Laboratory Guidebook**. Chapter 8.06, revised February 2005. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/>. Acesso em: Outubro de 2009.

VAN DER MEE-MARQUET, N. LOESSNER, M. J.; AUDURIER, A. Evaluation of seven experimental phages for inclusion in the international phage set for the epidemiological typing of *Listeria monocytogenes*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3374-3377, 1997.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Review**, v.14, p.584-640, 2001.

VIEIRA, S. L.; VIOLA, E. S.; OSTERMANN, D.; SANFELICE, A. M. **Metabolismo e Bases Conceituais para a Ação Benéfica de Ácidos Orgânicos para Frangos de Corte**. 2003 Disponível em: <http://www.aveworld.com.br/aveworld/publicacoes.asp?pais=brasil&codigo=53453>. Acesso em setembro de 2010.

VITAS, A. I.; AGUADO, V.; JALON, I. G. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 349-356, 2004.

WEAVER, R.A.; SHELEF, L.A. Antilisterial activity of sodium, potassium or calcium lactate in pork liver sausage. **Journal of Food Safety**, v. 13, p. 33–146, 1992.

WIGGINS, B. A.; ALEXANDER, M. Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. **Applied Environmental Microbiology**, v. 49, p. 19-23, 1985.

WOMMACK, K. E.; HILL, R. T.; MULLER, T. A.; COLWELL, R. R. Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1336-1341, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Working Group**, WHO Bulletin, v.66, p.421-428, 1988.

YOUNG, R. Phages Lysis. *In*: **Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology** (Waldor, M. K., Friedman, D. I. e Adhya, S. L. Eds). 1ª ed., pp 92-127. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 2005.

YUCEL, N.; CITAK, S.; GUNDOGAN, N. The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw meat. **Indian Veterinary Journal**, v. 81, n. 11, p. 1192-1194, 2000.

3M MICROBIOLOGY. **3M™ Petrifilm™ Placas de Listeria para controle ambiental**. 2005.

## CAPÍTULO 2

### EFICÁCIA DO BACTERIÓFAGO P100 NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO POR *Listeria monocytogenes* INOCULADA ARTIFICIALMENTE EM QUEIJOS DE MASSA MACIA

#### RESUMO

*Listeria monocytogenes* é o agente causal da listeriose, uma doença que pode atingir mulheres grávidas (e seus fetos), crianças, idosos e indivíduos com o sistema imunológico comprometido. Os alimentos são reconhecidos como fontes primárias da transmissão desta bactéria para o homem e a mesma já foi isolada de uma grande variedades de alimentos, principalmente queijos. A indústria tem procurado métodos cada vez mais eficazes para o combate do patógeno. Em 2007, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e a agência norte-americana Food and Drug Administration (FDA) aprovaram o uso do bacteriófago P100, LISTEX™ P100, uma solução antimicrobiana composta de seis bacteriófagos específicos para o controle de *Listeria monocytogenes* em alimentos. O P100, especificamente, é uma opção interessante, e sua aplicação pode ser integrada facilmente dentro da rotina diária do processo de produção. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do bacteriófago P100 sobre cepas de *Listeria monocytogenes* inoculadas artificialmente em queijos de massa macia, dos tipos Minas Frescal e Coalho. Determinou-se a contagem de células viáveis de *Listeria monocytogenes*, mistura dos sorotipos 1/2a e 4b, em amostras controle e em amostras submetidas ao tratamento pelo bacteriófago P100 nos tempos 0 (zero) e sete dias em armazenamento a 10 °C. Os resultados encontrados demonstraram a eficácia da utilização do bacteriófago P100, levando à redução de cerca de dois ciclos logarítmicos no tempo 0 (zero) para os dois tipos de queijos, com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Entretanto, em sete dias de armazenamento observou-se aumento na população do microrganismo (caráter psicrotrófico), em ambos os queijos, e embora o bacteriófago continuasse agindo, foi obtida uma redução decimal (RD) menor, aproximadamente 1 ciclo log, provavelmente devido à inibição do fago pelo abaixamento do pH do alimento. O uso de tecnologias alternativas para o controle de patógenos em alimentos, em especial de *Listeria monocytogenes*, deve ser mais bem estudada para se conseguir a erradicação da bactéria no alimento; além disso, o uso de substâncias GRAS, como bacteriófagos, deve ser incentivado junto às indústrias de alimentos.

**Palavras-chave:** Bacteriófago P100, *Listeria monocytogenes*, Queijos de massa macia.

## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* is the causal agent of listeriosis, an infection that targets mainly pregnant women (and their fetuses), children, elderly and those with compromised immune systems. Foods are recognized as primary sources of transmission of this bacterium to humans and has been isolated from a wide variety of foods, particularly cheeses. The industry has sought more effective methods to combat the pathogen. The bacteriophages, which are viruses that infect only bacteria and not cause any alteration in the food, either in flavor, color or other physical property of the product. In 2007, the Department of Agriculture of the USA (USDA) and the American Institution Food and Drug Administration (FDA) approved the use of LISTEX™ P100, one antimicrobial solution composed of six specific bacteriophages to control *Listeria monocytogenes* in food. The P100, specifically, is an interesting option, and its application can be easily integrated into the daily routine of the production process. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of the bacteriophage P100 on strains of *Listeria monocytogenes* in artificially inoculated soft cheeses, types of “Minas Frescal” and “Coalho”. Were determined the viable cell count for *Listeria monocytogenes*, mix of serotypes 1/2a and 4b, in control samples and samples treated by bacteriophage P100 in time 0 (zero) and seven days of storage at 10 °C. The results showed the effectiveness of the use of bacteriophage P100, leading to a reduction of about two logarithm cycles at time 0 (zero) for both types of cheese, which was statistically significant ( $p < 0.05$ ). However, in seven days of storage there was an increase in the population of the microorganism (psychrotrophic character), in both cheeses, and although the bacteriophage continued acting, was obtained a lower decimal reduction (DR), 1 log cycle approximately, probably due to inhibition of phage by lowering the pH of food. The use of alternative technologies for control the pathogens in foods, especially *Listeria monocytogenes*, should be further studied to achieve the eradication of bacteria in food, in addition, the use of GRAS substances, such as bacteriophage, should be encouraged along the food industries.

**Keywords:** Bacteriophage P100, *Listeria monocytogenes*, Soft cheeses.

## 1 INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes* é um importante patógeno de origem alimentar, e dentre os alimentos considerados de risco, pode-se citar os queijos. Estes, devido à sua composição, constituem-se em excelentes substratos para o crescimento de microrganismos, inclusive os da espécie de *Listeria monocytogenes*, considerada uma bactéria patogênica emergente com capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração e habilidade de sobreviver durante longos períodos sob condições adversas (NALDINI, 2002). A relevância deste patógeno em saúde pública diz respeito à doença resultante da sua infecção – a listeriose, cuja manifestação clínica pode levar ao comprometimento do sistema nervoso central, com a possibilidade da infecção acometer gestantes, com sérias conseqüências para os fetos (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Neste contexto, o surgimento de bactérias patogênicas resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos disponíveis tornou-se um problema crítico para a indústria de alimentos moderna. Então, o uso de tecnologias novas e mais eficazes abre fronteiras para a aplicação de bacteriófagos, que são vírus que infectam e matam as bactérias. Bacteriófagos ou fagos representam os inimigos naturais das bactérias pois são amplamente distribuídos no ambiente e representam parte da microbiota natural de alimentos (KENNEDY; BITTON, 1987).

Vários tipos de bacteriófagos tem sido isolados de alimentos, como por exemplo, os bacteriófagos que infectam *Propionibacterium freudenreichii*, isolados a partir de queijo suíço em níveis de até  $7 \times 10^5$  UFP/g (GAUTIER et al., 1995), fagos de bactérias lácticas termofílicas isolados em laticínios em níveis de até  $10^9$  UFP/mL (SUAREZ et al., 2002) e fagos de *Escherichia coli* isolados de um grande número de produtos, incluindo carne de frango e porco, carne moída, cogumelos, alface, vegetais crus, torta de frango e produtos de *delicatessen*, com números de fagos tão elevados quanto  $10^4$  UFP/g (ALLWOOD et al., 2004).

A aplicação de fagos em alimentos, devido à sua especificidade inerente, resulta na eliminação de apenas os organismos-alvo, sem comprometer a viabilidade de outras bactérias autóctones no habitat. Esta é uma propriedade desejada de um agente antimicrobiano para uso em alimentos, especialmente no caso dos alimentos fermentados e outros produtos produzidos com a ajuda de

bactérias (CHIBANI-CHENNOUFI et al., 2004). Além disso, os fagos não alteram as características organolépticas (sabor, cor, odor) dos alimentos, não deixam uma marca ecológica, pois decompõem-se em aminoácidos e ácidos nucleicos (PAO et al., 2004). Os bacteriófagos são considerados como aditivos e reconhecidos como seguros para o consumo – GRAS (*General Recognized as Safe*).

Dentre os patógenos que despertam maior preocupação para a indústria de alimentos estão a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter* e *Escherichia coli* patogênica. Destes, apenas *Listeria* coloniza regularmente instalações de processamento e, assim, é capaz de contaminar os alimentos ao longo do processo de produção (HAGENS; OFFERHAUS, 2008). Uma série de estudos sobre o sucesso do tratamento com fagos em diversos gêneros alimentícios contaminados com *Listeria* foram publicados (LEVERENTZ et al., 2003, 2004).

O uso do bacteriófago P100 (*pool* de 6 fagos) para eliminação da *L. monocytogenes* em queijos foi patenteado por CARLTON et al. (2005), e o produto foi nomeado de LISTEX™P100. Em 2007, o FDA aprovou o uso do LISTEX 100 para todos os alimentos. Em novembro deste mesmo ano, o LISTEX ganhou um prêmio de ouro na Europa como ingrediente alimentar por ser a melhor inovação na indústria de alimentos. Entretanto, no Brasil, ainda não é reconhecido o uso do produto, apenas para fins de pesquisa científica.

No presente estudo, objetivou-se avaliar a eficácia do bacteriófago P100 sobre células de *Listeria monocytogenes* inoculadas artificialmente em queijos de massa macia e a influência do tempo de tratamento sob refrigeração.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

#### 2.1.1 Microrganismos de Referência

*Listeria ivanovii* WSLC3009 (sorovar 5) (SLCC 4769),  
*Listeria monocytogenes* Scott A - ATCC 15313 (sorovar 4b),  
*Listeria monocytogenes* 1/2a isolada de lingüiça suína tipo frescal,  
Bacteriófago P100 (LISTEX™).

### 2.1.2 Alimentos

Queijo do tipo Minas Frescal: Entende-se por Queijo Minas Frescal, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É classificado com um queijo semi-gordo, de muito alta umidade, a ser consumido fresco. No processo de elaboração, é obtida uma massa coalhada, dessorada, não prensada, salgada e não maturada; acondicionado em embalagem plástica ou em envases bromatologicamente aptos. Possui consistência branda, macia; cor esbranquiçada; sabor suave ou levemente ácido, com forma cilíndrica e peso variando de 0,3 a 5kg (BRASIL, 1997).

Queijo do tipo Coalho: Entende-se por queijo de coalho, o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas. É classificado como um queijo de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida e apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0% e 60,0%. As características distintivas do processo de elaboração é devido a coagulação em torno de 40 minutos, corte e mexedura da massa, remoção parcial do soro, aquecimento da massa com água quente ou vapor indireto até obtenção de massa semicozida (até 45°C) ou cozida (entre 45° e 55°C), adição de sal (cloreto de sódio) à massa, se for o caso, prensagem, secagem, embalagem e estocagem em temperatura média de 10 - 12°C normalmente até 10 (dez) dias. Esse queijo poderá ser também elaborado a partir de massa crua (sem aquecimento). Apresenta consistência semidura, elástica; cor branco amarelado uniforme; sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado; com crosta fina, sem trinca, não sendo usual a formação de casca bem definida (BRASIL, 2001a).

### 2.1.3 Tratamento Antimicrobiano

Bacteriófago P100 (título aproximado de  $10^9$  UFP/mL), na concentração aproximada de 1,0 mL/65 cm<sup>2</sup> da superfície do produto (concentração aproximada de 30 g).

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Local do Estudo

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia.

### 2.2.2 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo transversal de caráter exploratório e experimental.

### 2.2.3 Amostragem e Tratamento das Amostras

Amostras de queijos de massa macia dos tipos Minas Frescal e Coalho foram adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Salvador/BA, com selo de inspeção estadual (S.I.E) ou federal (S.I.F.). As amostras foram colhidas nas suas embalagens originais sendo obtido pelo menos 200 g do material. Essa amostragem foi repetida por três vezes para cada tipo de queijo.

As amostras foram transportadas para o laboratório em recipientes isotérmicos com gelo reciclável, mantidas sob refrigeração e submetidas as análises no mesmo dia. A superfície superior dos queijos (casca) foi retirada assepticamente em capela de fluxo laminar tipo II (LABCONCO, modelo 36210 classe BII, Brasil) e fatiada com auxílio de garfos e facas estéreis, em pequenos pedaços, que foram transferidos para placas de Petri estéreis, pesando aproximadamente 30 gramas cada amostra (65 cm<sup>2</sup>).

### 2.2.4 Preparo da Suspensão Bacteriana de *Listeria monocytogenes*

Duas cepas de *Listeria monocytogenes* foram utilizadas para o experimento: *Listeria monocytogenes*, sorovar 1/2a, isolada de lingüiça suína tipo frescal e *Listeria monocytogenes* Scott A, sorovar 4b, ATCC 15313.

Culturas bacterianas de *L. monocytogenes* mantidas em ágar infusão de cérebro e coração (BHI) semi sólido (0,5% de Ágar) (DIFCO), sob refrigeração, foram ativadas em caldo tripticase de soja suplementado com 0,5% de extrato de levedura (TSB-YE) (DIFCO) a 35 °C por 24 horas, sob agitação em uma incubadora do tipo *shaker* (CIEN TEC, modelo CT 712, Brasil ) a 150 rpm. Após a ativação, 1,0 mL de cada cultura ativa de *L. monocytogenes* foi adicionado separadamente na superfície de duas placas contendo ágar tripticase de soja TSA-YE suplementado com 0,5% de extrato de levedura (0,5 mL em cada placa) (DIFCO), espalhando-se o inóculo com auxílio de alça de Drigasky estéril e incubando-se as placas a 35 °C por 24 horas. Posteriormente, as superfícies das placas foram lavadas com 2 mL de água peptonada tamponada (1 mL para cada placa) também com o auxílio de alça de Drigasky, transferindo-se em seguida a suspensão obtida para tubos do tipo eppendorf estéreis (VALADARES, 2000). A partir dessa suspensão foram realizadas diluições em tubos de ensaio contendo 900 µL de água peptonada tamponada, que foram então inoculadas em duplicata na superfície de placas contendo Ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam (LPM - DIFCO) modificado contendo 0,5% de esculina e 0,1 % de citrato férrico amoniacal e suplementado com o antibiótico moxalactam. Após incubação a 35 °C/ 48 horas, placas contendo entre 30 e 300 colônias foram selecionadas para contagem das células viáveis das duas cepas do microrganismo inoculadas e os resultados expressos como Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL). Este experimento foi repetido por três vezes e a média das contagens foi expressa como UFC/mL.

#### 2.2.5 Determinação do Título do Bacteriófago P100

Para a determinação do título do bacteriófago P100 foi utilizado o Protocolo da empresa fabricante do produto, EBI FOOD SAFETY, recomendado por Hagens e Offerhaus (2008) e Loessner (1997).

Foi utilizada uma cultura bacteriana de *Listeria ivanovii* como bactéria hospedeira, ativada em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (DIFCO) em meia concentração (1/2x), sendo ajustada a concentração de NaCl para 5 g/L, como no meio original, seguido de incubação *overnight* (18 a 24 h) a 30 °C em um incubador do tipo *shaker* a 150 rpm. Diluições decimais em duplicata do fago foram preparadas

em tampão lambda (STEWART et al., 1989) a partir de 100 µL do fago + 900 µL do tampão, agitando-se gentilmente durante dois segundos, no máximo, em agitador de tubos do tipo vortex (ALENMAR).

Para a etapa da infecção foram misturados 150 µL da bactéria hospedeira *L. ivanovii* e 100 µL de cada diluição do fago, que foram adicionados a 3,5 mL de ágar *soft* BHI (0,4% de ágar), resfriado em banho-maria (NOVA ÉTICA, modelo 500/1D, Brasil) a  $\pm 45$  °C e homogeneizado em agitador de tubos tipo vortex. Esta mistura foi vertida em placas de Petri estéreis contendo em média 16 mL de ágar BHI (1,2% de ágar) e incubadas a 30 °C por 20 a 24 h para determinação das Unidades Formadoras de Placas (UFP).

O princípio do método é baseado no fato de que, após a etapa de infecção, as células da bactéria infectadas pelo bacteriófago são lisadas e liberam partículas fágicas, que imediatamente são adsorvidas pela célula adjacente, e uma nova progênie fágica é obtida. A formação de halo ou placas de lise determinará a sensibilidade da bactéria ao fago e o número de halos indicará o título do mesmo.

Para determinação do título, foram contadas placas contendo entre 30 e 300 Unidades Formadoras de Placas (UFP), e a média das contagens foi expressa como UFP/mL.

#### 2.2.6 Ensaio para Avaliar a Eficácia do Bacteriófago P100

*Preparo das amostras de queijos de massa macia para os experimentos:* Pedacos de queijo obtidos assepticamente em cabine de fluxo laminar foram distribuídos em quatro placas de Petri estéreis, em área aproximada de 65 cm<sup>2</sup> em cada placa (c.a. de 30 gramas da amostra). Dessas quatro placas, duas foram identificadas como tempo (dia) zero do experimento, ou seja, o dia inicial a contar a vida de prateleira desse queijo sob refrigeração. As outras duas placas foram identificadas como tempo (dia) 7, relativo à vida de prateleira do queijo após aberto, sob refrigeração, especificada nos rótulos das amostras de queijo obtidos nos estabelecimentos comerciais.

Repetiu-se o experimento três vezes para cada tipo de queijo (Minas Frescal e Coalho).

*Preparo das amostras controle para Listeria monocytogenes:* Amostras de queijo anteriormente pesadas (30 g cada), correspondentes a duas placas de Petri, foram transferidas para sacos plásticos estéreis, sendo uma delas destinada ao controle para *L. monocytogenes* no produto no tempo zero e outra para o tempo 7, sob refrigeração. Em seguida, foi adicionado 1 mL da mistura dos inóculos de *L. monocytogenes* previamente obtidos (item 2.2.4), sendo 500 µL da suspensão bacteriana de *L. monocytogenes* sorovar 1/2a (população aproximada de  $6,2 \times 10^5$  UFC/mL) e 500 µL da suspensão bacteriana de *L. monocytogenes* Scott A, sorovar 4b (população aproximada de  $3,5 \times 10^5$  UFC/mL) em cada porção do alimento.

As amostras inoculadas foram massageadas com as mãos, para permitir uma distribuição uniforme da bactéria e a seguir deixadas por trinta minutos em capela de fluxo laminar para permitir a adesão bacteriana. Após esta etapa, a amostra identificada como tempo 7 foi armazenada sob refrigeração, para a contagem de células viáveis de *Listeria* no sétimo dia. À amostra do tempo zero foram adicionados 270 mL de tampão lambda com 0,01% de tween 80 (SYNTH), homogeneizada por 2 min em homogeneizador do tipo *Stomacher* (ITR modelo 1204, serie126, Brasil, 240bpm), obtendo-se a diluição  $10^{-1}$  (CARLTON et al., 2005). Foram feitas diluições decimais subseqüentes até  $10^{-4}$ , usando-se 100 µL da amostra homogeneizada e 900 µL do tampão lambda. Em seguida, foram inoculadas (100 µL em cada placa), em duplicata, as quatro diluições preparadas em placas contendo agar LPM modificado. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas e a contagem das células viáveis de *L. monocytogenes* foram realizadas em placas contendo entre 30 e 300 UFC. A média das contagens foi expressa como UFC/g.

*Tratamento das amostras:* Amostras provenientes de outras duas placas de Petri, uma para o dia zero e outra para o dia 7, foram pesadas (30 g cada) e transferidas para sacos plásticos estéreis. Em seguida, foi adicionado 1 mL dos inóculos previamente preparados de *L. monocytogenes*, sorovares 1/2a e 4b (inóculo com população aproximada de  $10^5$  UFC/mL). As amostras inoculadas foram massageadas com as mãos, para permitir uma distribuição uniforme da bactéria no alimento e, em seguida, foram deixadas por trinta minutos em capela de fluxo laminar, para permitir a adesão bacteriana. Após esta etapa, foi adicionado 1 mL do bacteriófago P100 em cada amostra (título aproximado de  $2,5 \times 10^9$  UFP/mL), e as amostras foram a seguir massageadas com as mãos, para permitir uma distribuição

uniforme do fago. Deixou-se agir por 30 minutos para permitir a etapa de infecção, e em seguida, a amostra do tempo 7 foi colocada sob refrigeração para a contagem das células viáveis de *L. monocytogenes* no sétimo dia. À amostra do tempo zero foram adicionados 270 mL de tampão lambda com 0,01% de tween 80 (SYNTH), homogeneizada por 2 min em homogeneizador do tipo *Stomacher*, obtendo-se a primeira diluição. Foram feitas diluições decimais subseqüentes até  $10^{-4}$ , usando-se 100  $\mu$ L da amostra homogeneizada e 900  $\mu$ L do tampão lambda. Em seguida, as diluições decimais foram inoculadas (100  $\mu$ L), em duplicata, em placas contendo ágar LPM modificado. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas e as contagens das células viáveis de *L. monocytogenes* foram realizadas em placas contendo entre 30 e 300 UFC. A média das contagens foi expressa como UFC/g.

### 2.2.7 Análise Estatística

O tratamento das amostras com seu respectivo controle, foi realizado por três vezes, sendo as contagens das Unidades Formadoras de Placas (UFP) ou Unidades Formadoras de Colônias (UFC) obtidas sempre em duplicata e expressas como valor médio das contagens. Todas as contagens obtidas foram convertidas em logaritmos e o número de reduções decimais (RD) foi calculado através da diferença entre a contagem inicial das células (controle *Listeria*) e a contagem final obtida após o tratamento com o bacteriófago P100, nos tempos zero e sete dias, sob refrigeração.

O experimento foi conduzido em esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas os dois tratamentos (amostras de queijos inoculados artificialmente com *L. monocytogenes* e amostras inoculadas com o patógeno e posteriormente adicionadas do bacteriófago P100) e, nas subparcelas, dois períodos (tempo zero e 7). Para a avaliação estatística foram utilizadas a análise de variância e o teste de Tukey para determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores médios das contagens microbianas obtidas após os tratamentos.

Para execução das análises estatísticas, utilizou-se o software ASSISTAT (versão 7.6 beta) (2011).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 OBTENÇÃO DO INÓCULO DE *Listeria monocytogenes* E DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DO BACTERIÓFAGO P100

O valor médio das contagens obtidas no preparo da suspensão de *Listeria monocytogenes* pode ser observado na Tabela 1. A população do inóculo bacteriano de *Listeria monocytogenes* 1/2a obtida foi de  $6,2 \times 10^9$  UFC/mL. Essa população foi diluída até  $6,2 \times 10^5$  UFC/mL com água peptonada tamponada para a realização dos experimentos. A suspensão bacteriana de *Listeria monocytogenes* Scott A, sorovar 4b obtida foi de  $3,5 \times 10^9$  UFC/mL, e a mesma foi posteriormente diluída para  $3,5 \times 10^5$  UFC/mL. A escolha da população do inóculo para contaminação artificial do queijos (c.a.  $10^5$  UFC/mL) foi baseada nas recomendações de Carlton et al. (2005), visando a obtenção de uma população final de *L. monocytogenes* na amostra (após a adesão) de aproximadamente  $10^3$  UFC/g.

**TABELA 1.** População de *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b (UFC/ mL), obtida no preparo das suspensões bacterianas.

Ensaio	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a		<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	
	UFC/mL	Log UFC/mL	UFC/mL	Log UFC/mL
1	$8,3 \times 10^9$	9,9	$2,7 \times 10^9$	9,4
2	$5,1 \times 10^9$	9,7	$3,7 \times 10^9$	9,5
3	$5,2 \times 10^9$	9,7	$4,1 \times 10^9$	9,6
<b>Média<sup>a</sup></b>	<b><math>6,2 \times 10^9 \pm 1,8</math></b>	<b><math>9,8 \pm 0,1</math></b>	<b><math>3,5 \times 10^9 \pm 0,7</math></b>	<b><math>9,5 \pm 0,1</math></b>

<sup>a</sup>  $\pm$ desvio-padrão

Em relação ao título do bacteriófago P100, o valor médio das contagens obtidas foi de  $2,5 \times 10^9$  UFP/mL, como demonstrado na Tabela 2.

**TABELA 2.** Título (UFP/mL) do Bacteriófago P100.

Ensaio	Bacteriófago P100	
	UFP/mL	Log UFP/mL
1	$2,4 \times 10^9$	9,4
2	$2,9 \times 10^9$	9,5
3	$2,2 \times 10^9$	9,3
<b>Média<sup>a</sup></b>	<b><math>2,5 \times 10^9 \pm 0,4</math></b>	<b><math>9,4 \pm 0,1</math></b>

<sup>a</sup>  $\pm$  desvio-padrão

O valor médio encontrado para o título do bacteriófago P100 foi inferior ao indicado no rótulo do produto:  $10^{11}$  UFP/mL. Porém, o valor encontrado ainda estava dentro da recomendação de Carlton et al. (2005), que seria o uso de 1 mL do produto com título de  $10^9$  UFP/mL para 30-40 g ( $65 \text{ cm}^2$ ) da amostra. A recomendação da FDA (2006) é de que se use no máximo 1 mL do fago P100 com título  $10^{11}$  UFP/mL para  $500 \text{ cm}^2$  do produto pronto para o consumo.

### 3.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO BACTERIÓFAGO P100 SOBRE CÉLULAS DE *Listeria monocytogenes* INOCULADAS EM AMOSTRAS DE QUEIJOS DE MASSA MACIA

#### 3.2.1 Amostras de Queijo Controle para Células de *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b

Os valores obtidos para a população de *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, inoculada artificialmente em 30 g das amostras nos tempos (dias) zero e 7, estão demonstrados nas TABELAS 3 e 4.

Os valores da população de *L. monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, demonstram que o período de 30 minutos foi suficiente para adesão completa da bactéria, tanto para o queijo do tipo Minas Frescal quanto para o queijo do tipo Coalho. Porém, após sete dias de refrigeração das amostras, observou-se um aumento da população de *L. monocytogenes* de 5,7 log UFC/g para 6,5 log UFC/g

nas amostras do queijo Minas Frescal e de 5,4 log UFC/g para 6,5 log UFC/g nas do queijo Coalho (TABELAS 3 e 4).

**TABELA 3.** População de *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, após a inoculação das amostras de queijo tipo Minas Frescal, nos tempos zero e sete dias.

<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>a</sup>	Tempo (Dias)				
	Experimento	Zero		Sete	
		UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g
1	8,6 x 10 <sup>5</sup>	5,9	3,8 x 10 <sup>6</sup>	6,6	
2	9,7 x 10 <sup>5</sup>	6,0	3,3 x 10 <sup>6</sup>	6,5	
3	1,4 x 10 <sup>5</sup>	5,1	3,1 x 10 <sup>6</sup>	6,5	
<b>Média<sup>b</sup></b>	<b>6,6 x 10<sup>5</sup> ± 4,5</b>	<b>5,7 ± 0,5</b>	<b>3,4 x 10<sup>6</sup> ± 0,3</b>	<b>6,5 ± 0,05</b>	

<sup>a</sup> População do inóculo: aproximadamente 5,7 log UFC/mL.

<sup>b</sup> ± desvio-padrão

**TABELA 4.** População de *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, após a inoculação das amostras de queijo tipo Coalho, nos tempos zero e sete dias.

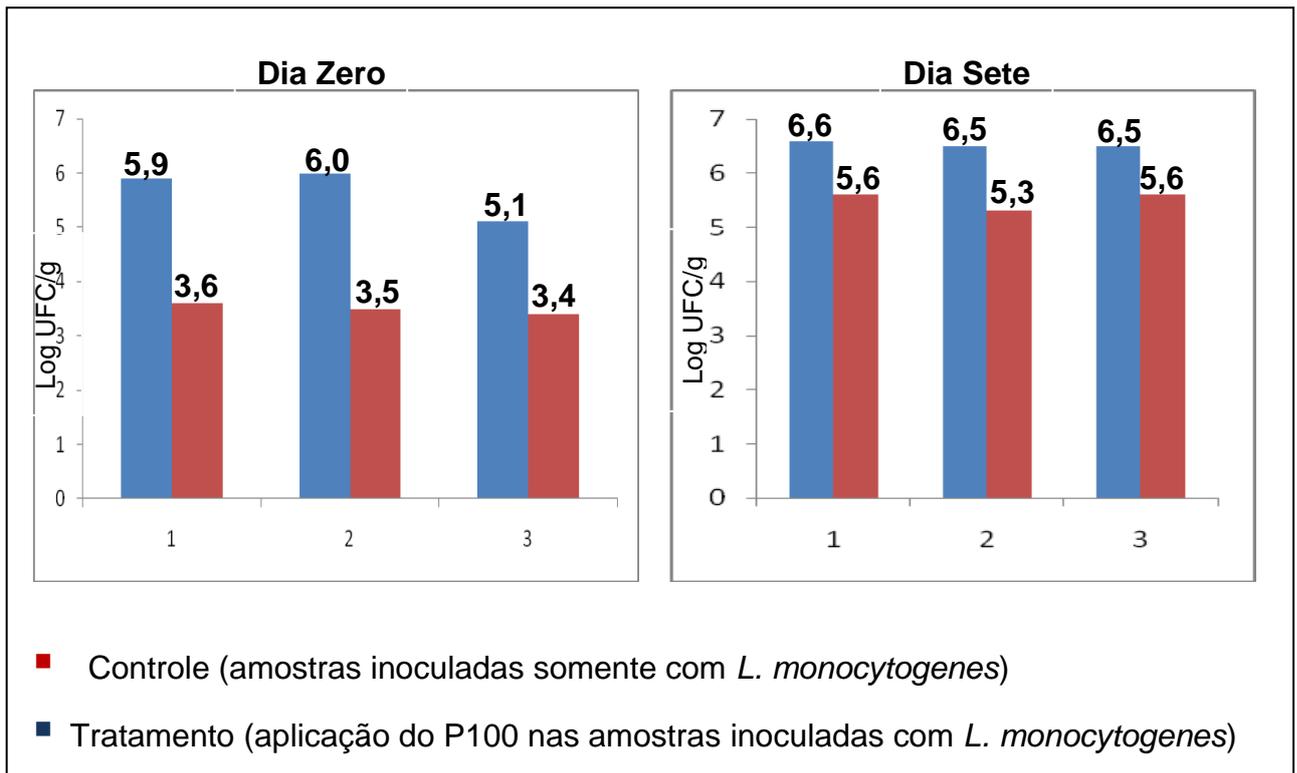
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>a</sup>	Tempo (Dias)				
	Experimento	Zero		Sete	
		UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g
1	1,4 x 10 <sup>5</sup>	5,1	3,2 x 10 <sup>6</sup>	6,5	
2	3,6 x 10 <sup>5</sup>	5,6	3,6 x 10 <sup>6</sup>	6,6	
3	3,6 x 10 <sup>5</sup>	5,6	2,8 x 10 <sup>6</sup>	6,4	
<b>Média<sup>b</sup></b>	<b>2,9 x 10<sup>5</sup> ± 1,3</b>	<b>5,4 ± 0,3</b>	<b>3,2 x 10<sup>6</sup> ± 0,4</b>	<b>6,5 ± 0,1</b>	

<sup>a</sup> População do inóculo: aproximadamente 5,7 log UFC/mL.

<sup>b</sup> ± desvio-padrão

### 3.2.2 Tratamento das Amostras de Queijos Inoculadas Artificialmente com *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, com o Bacteriófago P100.

Os resultados apresentados na Figura 1 demonstram o efeito do bacteriófago P100 no controle da contaminação por *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal nos tempos zero e sete dias.



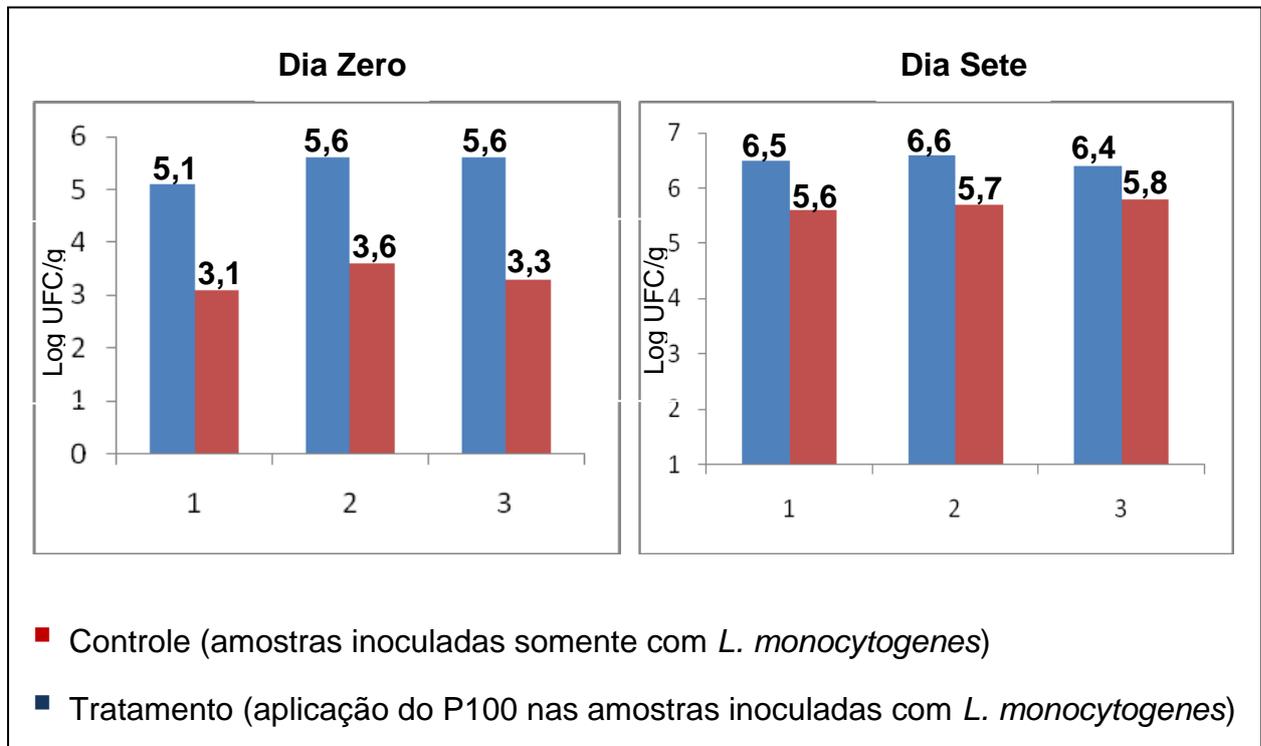
**FIGURA 1.** Efeito do bacteriófago P100 no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo do tipo Minas Frescal no dia zero e após sete dias em armazenamento a 10°C.

A partir destes resultados, verifica-se que no primeiro experimento, no tempo zero, o fago reduziu em 2,3 ciclos logarítmicos o número de células viáveis de *L. monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, inoculadas nas amostras do queijo Minas. Porém, após setes dias de armazenamento sob refrigeração, essa redução foi de apenas 1,1 ciclo logarítmico.

No segundo experimento observa-se comportamento semelhante em relação ao primeiro, ou seja, no tempo zero a redução foi de 2,5 ciclos log (6,0 log UFC/g para 3,5 log UFC/g), enquanto que após sete dias de armazenamento a

redução alcançada foi de apenas 1,2 ciclos log (6,5 log UFC/g para 5,3 log UFC/g). No terceiro experimento, a redução observada no dia zero foi inferior à dos outros dois experimentos, ou seja, 1,7 ciclos log, com contagem inicial de *L. monocytogenes* na amostra controle na ordem de 5,1 log UFC/g e na amostra tratada de 3,4 log UFC/g. No sétimo dia, a redução observada na população bacteriana também foi inferior, apenas 0,9 ciclos log.

A Figura 2 apresenta os resultados obtidos no tratamento com o bacteriófago P100 nas amostras do queijo do tipo Coalho, nos tempos zero e sete dias.



**FIGURA 2.** Efeito do bacteriófago P100 no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo do tipo Coalho no dia zero e após sete dias em armazenamento a 10°C.

No queijo do tipo Coalho resultados semelhantes aos do queijo tipo Minas frescal foram encontrados, possivelmente por se tratarem de queijos de massa macia e os mesmos apresentarem características químicas e físicas semelhantes. Nos primeiro e segundo experimentos conduzidos com as amostras do queijo Coalho, o fago P100 conseguiu reduzir a população de *Listeria* em 2,0 ciclos log (5,1 log UFC/g para 3,1 log UFC/g) e 2,3 ciclos log (5,6 log UFC/g para 3,6 log UFC/g),

respectivamente. Após 7 dias de armazenamento, observou-se a mesma redução decimal para os dois experimentos, ou seja, 0,9 log UFC/g.

No experimento três, os resultados demonstram que no tempo inicial o fago reduziu em 2,3 ciclos logarítmicos o número de células viáveis de *L. monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, inoculadas nas amostras de queijo Coalho. Entretanto, após setes dias de armazenamento sob refrigeração, para essa mesma amostra houve redução na população de *Listeria* de 6,4 log UFC/g para 5,8 log UFC/g, ou seja RD de apenas 0,6 ciclos log, o que representou a menor redução encontrada nos experimentos conduzidos com os dois tipos de queijos.

Similar aos resultados do presente estudo, Leverentz et al. (2003) relataram uma redução inicial de 2 ciclos log na contagem de *L. monocytogenes* em superfícies de melão pelo bacteriófago LMP-102, seguido por um aumento de 2 ciclos log na população da bactéria durante o período de armazenamento de 7 dias a 10 °C. Ainda, em tecidos de frango, o tratamento com fago específico para *Campylobacter* resultou em uma redução inicial de 1,2 ciclos log sem apresentar subsequente redução durante o período de 10 dias de armazenamento (ATTERBURY et al., 2003).

Dessa forma, observa-se que no presente estudo a Redução Decimal (RD) na população bacteriana somente foi expressiva, acima de 2 ciclos logarítmicos, no dia zero, ou seja, antes das amostras tratadas com o fago serem armazenadas sob refrigeração. A refrigeração, por sua vez, levou ao aumento da população microbiana (caráter psicrótrófico) e o bacteriófago não demonstrou eficácia como foi observado no dia zero do tratamento das amostras. Esses resultados podem ser explicados pelo aumento da microbiota competitiva (bactérias lácticas) nos queijos, com provavelmente redução do pH do alimento, o que, segundo a literatura pode inibir a ação fágica.

Em estudo realizado por Leverentz et al. (2003), uma mistura de diferentes fagos para *Listeria* foi empregada para reduzir os níveis do patógeno na superfície de melões e fatias de maçãs artificialmente contaminadas. Segundo esses autores, a mistura de fagos reduziu a contagem de células viáveis de *Listeria* entre 2,0 e 4,6 ciclos log em melões, enquanto o efeito em maçãs foi de apenas 0,4 ciclo logaritmo. Ainda, segundo os autores, a investigação do efeito lítico de bacteriófagos específicos para *Salmonella* na redução da população do microrganismo em fatias de melão fresco e maçã, contaminados experimentalmente, indicou que o baixo pH

das fatias de maçã (pH 4,2 versus pH 5,8 para as fatias de melão) pode ter contribuído para a ineficácia do tratamento com o bacteriófago. Uma vez que o pH do alimento não se encontra na faixa crítica, a inativação das partículas fágicas pode ser devido secundariamente a compostos presentes naturalmente em alimentos, conhecidos por inativar vírus e bacteriófagos, tais como os ácidos orgânicos.

Ainda, segundo a literatura, a eficácia de partículas fágicas em substrato alimentar pode ser afetada pelo tipo de matriz alimentícia (ou seja, líquido ou sólido); e a imobilização do fago pode ser devido à redução do teor de água de superfície, e a capacidade de certos fatores alimentares associados que levam à degradação estrutural das partículas fágicas (HAGEN; OFFERHAUS, 2008; GUENTHER et al., 2009).

A redução das contagens de *L. monocytogenes*, Scott A e 1/2a, em tecido de salmão fresco como uma função da densidade ou população fágica do bacteriófago P100, mostrou que o efeito de variar a concentração do fago ( $10^4$  a  $10^8$  UFP/g) nas amostras inoculadas com 4 log UFC/g de *L. monocytogenes* foram proporcionais à densidade fágica, ou seja, o aumento na concentração fágica levou ao aumento na diminuição da população bacteriana. Os autores também afirmaram que não houve redução significativa ( $p > 0,05$ ) nas contagens de *L. monocytogenes* em filé de salmão quando o mesmo foi tratado com baixa dose do fago P100 a  $10^4$  UFP/g, comparado ao controle não tratado. Ainda segundo os autores, o fago P100 em doses de  $10^5$  e  $10^6$  UFP/g, resultou em redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), de 0.5 e 1.2 log UFC/g de *L. monocytogenes*, respectivamente. O tratamento com o fago na concentração de  $10^7$  UFP/g resultou em 2 ciclos log de redução nas contagens de *L. monocytogenes*, enquanto o tratamento com dose mais alta do P100,  $10^8$  UFP/g, foi mais efetivo levando a uma RD de 3,5 ciclos log nas contagens de *L. monocytogenes* dentro de 2 horas (KAMLESH; RAMAKRISHNA, 2010).

No presente estudo, em geral, o tratamento com o fago P100, concentração de  $2,5 \times 10^9$  UFP/mL ou  $8,3 \times 10^7$  UFP/g, foi eficiente levando a uma redução decimal expressiva da população bacteriana inoculada nas amostras de queijos, antes do armazenamento dessas amostras sob refrigeração, porém as contagens de *L. monocytogenes* ainda se encontravam perigosas, considerando a exigência de ausência do microrganismo em 25 g da amostra (BRASIL, 2001b).

Outro fator que pode influenciar a ação do fago é o tempo de infecção. Em estudo com *cattfish* (bagre), houve uma redução média de 0,8 log UFC/g, utilizando-se 15 min de infecção para o tratamento com o fago P100 e os sorotipos 1/2a e 4b de *L. monocytogenes*. Segundo os autores, essa diferença não foi estatisticamente significativa do grupo controle, enquanto que o uso de 30, 60 e 120 min de infecção para o tratamento com o fago P100, levou a uma redução maior na população de *L. monocytogenes*, na faixa de 1,3-1,6 log UFC/g, não se observando diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tempos 30, 60 e 120 minutos. Esses últimos tratamentos mostraram reduções significativamente maior do que o tratamento usando 15 min para a etapa da infecção (SONI; NANNAPANENI; HAGENS, 2009).

A literatura também relata que a cepa *Listeria monocytogenes* Scott A, sorotipo 4b, apresenta maior resistência à ação de bacteriófagos e outros métodos usados no controle do crescimento bacteriano em alimentos (CZUPRYNSKI; FAITH; STEINBERG, 2002), mas, segundo os autores, quando comparada à cepas de outros sorotipos, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Considerando a multiplicação da bactéria em condições de refrigeração devido ao seu caráter psicrófilo, a sua resistência a baixo pH e a ineficácia ou baixa eficácia do fago P100 (RD menor que 1 ciclo log) sobre amostras de queijos armazenadas sob refrigeração, é importante que novos estudos sejam conduzidos com doses mais altas do bacteriófago P100 na tentativa de erradicar *L. monocytogenes* das amostras de queijos sob refrigeração. É importante considerar a população da bactéria inoculada nas amostras, que foram superiores às aquelas usadas nos experimentos conduzidos por outros investigadores, aproximadamente  $10^3$  UFC/g.

### 3.3. Análise Estatística

De acordo com os dados encontrados, relacionados à sobrevivência de *L. monocytogenes* em função da adição ou não do fago P100, englobando os dois períodos (tempo zero e 7), apresentados nas Tabelas 5 e 6, pode-se observar que houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, nos dois tipos de queijos.

**TABELA 5.** Valores médios das contagens de *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b (log de UFC/g), nas amostras de queijo Minas Frescal em função da adição ou não do bacteriófago P100, nos tempos zero e sete dias.

<i>Listeria monocytogenes</i> (Log <sub>10</sub> UFC/g)		
Tratamento	0 dia	7 dias
Sem adição do P100	5,7 a*	6,5 a
Com adição do P100	3,5 b	5,5 b

\* Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

**TABELA 6.** Valores médios das contagens de *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b (log de UFC/g), nas amostras de queijo do tipo Coalho em função da adição ou não do bacteriófago P100, nos tempos zero e sete dias.

<i>Listeria monocytogenes</i> (Log <sub>10</sub> UFC/g)		
Tratamento	0 dia	7 dias
Sem adição do P100	5,4 a*	6,5 a
Com adição do P100	3,3 b	5,7 b

\* Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Os resultados apresentados demonstram que houve redução média de 2,2 ciclos log na população de *L. monocytogenes* presente nas amostras de queijo Minas Frescal contaminadas artificialmente com *L. monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, e posteriormente adicionadas do bacteriófago P100, no tempo zero e essa diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Embora no tempo sete a RD tenha sido pouco expressiva, apenas 1,0 ciclo log, a diferença nas contagens da população bacteriana antes e após o tratamento também foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5).

No queijo do tipo Coalho, o tratamento com o bacteriófago conseguiu reduzir em cerca de 2,1 ciclos log a população de *L. monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, no tempo 0 (zero) e a diferença observada nas contagens das células viáveis do microrganismo foi estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Já

após sete dias sob refrigeração a RD foi de apenas 0,8 ciclo log, mas também observou-se diferença significativa entre as contagens obtidas ( $p < 0,05$ ) (Tabela 6).

Os resultados demonstram que a aplicação do bacteriófago foi eficaz no controle da contaminação por *L. monocytogenes* nas amostras dos dois tipos de queijos, embora a população do microrganismo continuasse elevada. Finalmente, pode-se perceber que apesar da redução na população do microrganismo tenha sido mais expressiva no tempo 0, a análise estatística demonstrou a continuidade da ação do bacteriófago no controle da contaminação por *L. monocytogenes* em temperaturas de refrigeração.

#### **4 CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que o bacteriófago P100 é eficaz no controle da contaminação por *L. monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, inoculadas em queijos de massa macia, dos tipos Minas e Coalho, porém essa eficácia foi menor nas amostras tratadas e armazenadas sob refrigeração durante sete dias, devido provavelmente ao aumento da população bacteriana (caráter psicrófilo da bactéria). Há de se considerar também a possibilidade de proliferação de bactérias lácticas, microbiota natural dos queijos, com consequente abaixamento do pH do alimento, e consequentemente uma possível inibição da ação do bacteriófago P100.

## REFERÊNCIAS

- ALLWOOD, P. B.; MALIK, Y. S.; MAHERCHANDANI, S.; VOUGHT, K.; JOHNSON, L. A.; BRAYMEN, C.; HEDBERG, C. W.; GOYAL, S. M. Occurrence of *Escherichia coli*, noroviruses and F-specific coliphages in fresh market-ready produce. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2387, 2004.
- ATTERBURY, R. J.; CONNERTON, P. L.; DODD, C. E.; REES C. E.; CONNERTON, I. F. Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6302–6306, 2003.
- BRASIL. Portaria nº 352 de 4 de setembro de 1997. Aprovar o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 1, p. 19684, 8 set. 1997.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 30 de 26 de julho de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 1, p. 14-15,16 julho 2001a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 7-E, 10 janeiro 2001b.
- CARLTON, R.M.; NOORDMAN, W.H.; BISWAS, B.; MEESTER, E.D.; LOESSNER, M.J. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 43, p. 301–312, 2005.
- CHIBANI-CHENNOUFI, S.; BRUTTIN, A.; DILLMANN, M. L.; BRÜSSOW, H. Phage-host interaction: an ecological perspective. **Journal Bacteriology**, v. 186, p. 3677–3686. 2004.
- CZUPRYNSKI, C. J.; FAITH, N. G.; STEINBERG, H. Ability of the *Listeria monocytogenes* strain Scott A to cause systemic infection in mice infected by the intragastric route. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2893–2900, 2002.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **FDA approval of Listeria-specific bacteriophage preparation on ready-to-eat (RTE) meat and poultry products**. August 2006. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/FDAcenter>. Acesso em: Outubro de 2009.
- GAUTIER, M. A.; ROUAULT, A.; SOMMER, P.; BRIANDET, R. Occurrence of *Propionibacterium freudenreichii* bacteriophages in Swiss cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2572, 1995.

GUENTHER S.; HUWYLER D.; RICHARD S.; LOESSNER M. J. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 93–100, 2009.

HAGENS, S.; OFFERHAUS, M. L. Bacteriophages – New weapons for foods safety. **Food Technology**, v. 62, n. 4, p. 46-54, 2008.

KAMLESH A. S.; RAMAKRISHNA, N. Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 1, p. 32-38, 2010.

KENNEDY, J. E. J.; BITTON, G. Bacteriophages in foods. *In*: GOYAL, S. M.; GERBA, C.P.; BITTON, G. (Eds). **Phage ecology**. New York: John Wiley & Sons, p. 289-316, 1987.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W. S.; CAMP, M. J.; JANISIEWICZ, W.J.; ABULADZE, T.; YANG, M.; SAFTNER, R.; SULAKVELIDZE, A. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4519–4526, 2003.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W. S.; JANISIEWICZ, W.; CAMP, M. J. Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1682, 2004.

LOESSNER, M.J.; RUDOLF, M.; SCHERER, S. Evaluation of luciferase reporter bacteriophage A511: lux AB for detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated foods. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2961-5, 1997.

NALDINI, M. C. M. **Comportamento diferencial de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborados pelo método convencional e por acidificação direta**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2002. 72f.

PAO, S.; RANDOLPH, S. P.; WESTBROOK, E. W.; SHEN, H. Use of bacteriophages to control *Salmonella* in experimentally contaminated sprout seeds. **Journal Food Science**, v. 69, p. 127–130, 2004.

SONI, K. A.; NANNAPANENI, R.; HAGENS, S. Reduction of *Listeria monocytogenes* on the Surface of Fresh Channel Catfish Fillets by Bacteriophage Listex P100. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.00, n. 00, p.1– 8. 2009.

STEWART, G. S. A. B.; JASSMIN, A. A.; DENYERS, P.; NEWBY, P.; LINLEY, K.; DHIR, V. K. The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4h using bacteriophage amplification. **Journal Applied Microbiology**, v. 84, p. 777-783, 1989.

SUAREZ, V. B.; QUIBERONI, A.; BINETTI, A. G.; REINHEINER, J. A. Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinean dairy industries. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1567, 2002.

VALADARES, G. F. **Detecção do fator de colonização CS31A em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia e sua associação com fatores de virulência.** Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, 2000. 81f.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Review**, v.14, p. 584-640, 2001.

## CAPÍTULO 3

### EFICÁCIA DE SAIS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DE CADEIA CURTA NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO POR *Listeria monocytogenes* INOCULADA ARTIFICIALMENTE EM QUEIJOS DE MASSA MACIA

#### RESUMO

A partir da década de 1980, o aumento de surtos de listeriose humana e a possível relação com alimentos contaminados vêm preocupando as autoridades sanitárias. No Brasil, não existe descrição de surtos de listeriose de origem alimentar, porém em diversos trabalhos é relatada a presença de *Listeria monocytogenes* em vários produtos, inclusive queijos. O emprego de substâncias consideradas GRAS ou “Geralmente Reconhecidas como Seguras” é uma boa alternativa para o controle deste patógeno em alimentos. Estratégias antimicrobianas para superar a tolerância da *Listeria monocytogenes* a baixas temperaturas são essenciais e o uso de ácidos orgânicos de cadeia curta pode ser promissor em combinação ou não com outros tratamentos. A atividade antimicrobiana dos sais de sódio e de outros ácidos orgânicos de cadeia curta, como o ácido cítrico, ácido acético e combinações do seus sais tem sido relatada. Sais de ácidos orgânicos tais como lactato de sódio ou lactato de potássio e diacetato de sódio são usados extensivamente na indústria de carne e de aves para alcançar os benefícios antimicrobianos. Entretanto, estudos publicados sobre atividade antimicrobiana dessas substâncias sobre *Listeria monocytogenes* em queijos são limitados. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de sais de ácidos orgânicos sobre cepas de *Listeria monocytogenes* inoculadas artificialmente em queijos de massa macia, dos tipos Minas Frescal e Coalho. Determinou-se a contagem de células viáveis de *Listeria monocytogenes*, mistura dos sorotipos 1/2a e 4b, em amostras controle e em amostras submetidas a dois tratamentos: combinação das soluções de lactato de sódio a 2% (p/v) com acetato de sódio a 0,25% (p/v) e propionato de sódio a 2% (p/v) com acetato de sódio a 0,25% (p/v), nos tempos 0 (zero) e em sete dias em armazenamento a 10 °C. Os resultados encontrados demonstram a eficácia da utilização dos tratamentos com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), para 0 (zero) e sete dias de tratamento a 10 °C, para ambos os queijos. Entretanto, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os tipos de tratamento aplicados. O estudo demonstra que a aplicação de sais de ácidos orgânicos de cadeia curta pode ser uma alternativa viável no controle da contaminação por *Listeria monocytogenes* em queijos de massa macia Minas Frescal e Coalho.

**Palavras-chave:** Sais de ácidos orgânicos, *Listeria monocytogenes*, Queijos de massa macia.

## ABSTRACT

Since the 1980s, the increase in outbreaks of human listeriosis and the possible relation with contaminated food has been a concern of sanitary authorities. In Brazil, there is no description of outbreaks of foodborne listeriosis, but is reported in several studies the presence of *Listeria monocytogenes* in various products, including cheeses. The use of substances considered GRAS or "Generally Recognized as Safe" is a good alternative to control this pathogen in foods. Antimicrobial strategies to overcome tolerance of *Listeria monocytogenes* at low temperatures are essential and the use of short chain organic acids only or in combination with other treatments may be promising. The antimicrobial activity of sodium salts and other organic acids short chain such as citric acid, acetic acid and combinations of salts has been reported. Salts of organic acids such as sodium lactate or potassium lactate and sodium diacetate are used extensively in industry for meat and poultry to achieve the benefits of antimicrobial agents. However, studies on antimicrobial activity of these substances on *Listeria monocytogenes* in cheese are limited. Thus, the purpose of this study was to evaluate the effectiveness of salts of organic acids on strains of *Listeria monocytogenes* in artificially inoculated soft cheeses, types of "Minas Frescal" and "Coalho". Was determined the viable cell count for *Listeria monocytogenes*, mix of serotypes 1/2a and 4b, in control samples and samples subjected to two treatments: the combination of solutions of sodium lactate, 2% (w/v) with acetate sodium 0.25% (w/v) and sodium propionate 2% (w/v) with sodium acetate 0.25% (w/v) in times 0 (zero) and seven days of storage at 10 °C. The results showed that the treatments was statistically significant ( $p < 0.05$ ), for the day zero and seven for both cheeses. However, there was no difference between the types of treatment applied. The study shows that the application of salts of organic acids short chain can be a viable alternative in the control of contamination by *Listeria monocytogenes* in soft cheeses like this "Minas Frescal" and "Coalho".

**Keywords:** Salts of organic acids, *Listeria monocytogenes*, Soft cheeses.

## 1 INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes*, uma bactéria gram-positiva, é reconhecida como um patógeno transmitido, principalmente, por alimentos contaminados, com impacto significativo para a saúde do ser humano (FARBER; PETERKIN, 1991). Desde a década de 80 vários surtos tem sido relatados e os principais focos da infecção têm sido associados ao consumo de repolhos contaminados (SCHLECH et al., 1983), queijos (JAMES et al., 1985) e leite pasteurizado (FLEMING et al., 1985).

Atualmente, a *L. monocytogenes* representa uma grande preocupação para as indústrias de alimentos em todo o mundo, devido à alta mortalidade por listeriose em populações susceptíveis e à resistência do patógeno aos vários métodos de conservação de alimentos. Em particular, a capacidade do microrganismo de crescer em temperaturas de refrigeração (WALKER; ARCHER; BANKS, 1990) e em superfícies secas (WONG, 1998), e a sua tolerância a condições ácidas (AHAMAD; MARTH, 1990; CONNER; SCOTT; BERNARD, 1990), permitem ao patógeno se adaptar bem a ambientes de processamento de alimentos, ambientes estes que normalmente restringiriam o crescimento bacteriano. Conseqüentemente, o controle desta bactéria é um importante desafio para os processadores de alimentos.

A acidificação dos alimentos com ácidos orgânicos de cadeia curta e/ou seus sais, pela adição intencional ou por fermentação, é um importante mecanismo para controlar microrganismos que possam transmitir doenças através dos alimentos. Esses produtos, geralmente reconhecidos como seguros (GRAS), podem ser adicionados nos produtos alimentícios e podem servir como obstáculos para controlar ou impedir a transmissão da listeriose ou outras doenças de origem alimentar (AHAMAD; MARTH, 1990).

Estudos em alimentos demonstram a inibição efetiva de *L. monocytogenes* pela incorporação de lactato de sódio a 2% (p/v) em produtos cárneos embalados a vácuo e armazenados em temperaturas de 1 - 7 °C (UNDA; MOLINS; WALKER, 1991; QVIST; SEHESTED; ZEUTHEN, 1994) e também em salsicha de fígado de porco a 5 °C (WEAVER; SHELAF, 1993), usando lactato de sódio a 3% (p/v). Outros estudos demonstram que o lactato de sódio a 2,5% (p/v) sozinho não impediu o crescimento de *L. monocytogenes* em carne de peru armazenada a 4 °C, mas quando em combinação com diacetato a 0,1% (p/v), a

inibição do crescimento da bactéria foi verificada por pelo menos 6 semanas (SCHLYTER et al., 1993). Os autores também relataram que o uso de apenas diacetato a 0,1% (p/v) foi ineficaz para o controle do crescimento bacteriano no alimento.

Vários estudos tem demonstrado que a *L. monocytogenes* é mais ácido tolerante que a maioria dos patógenos de origem alimentar, embora a sensibilidade do organismo a ácidos orgânicos varia de acordo com a natureza do acidulante utilizado (SORRELLS; ENIGL; HATFIELD, 1989). Ademais, um fator relevante para a sobrevivência desta bactéria em alimentos é que sua tolerância ao pH ácido pode ser reforçada através da exposição do organismo a condições moderadamente ácidas (DAVIS; COOTE; O'BYRNE, 1996; KROLL; PATCHETT, 1992), um fator que pode reduzir ainda mais a eficácia dos sistemas de conservação à base de ácidos contra *L. monocytogenes*.

No presente estudo, objetivou-se avaliar a eficácia de sais de ácidos orgânicos de cadeia curta sobre células de *Listeria monocytogenes* inoculadas artificialmente em queijos de massa macia e a influência do tempo de tratamento sob refrigeração.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Microrganismos de Referência

*Listeria monocytogenes* Scott A - ATCC 15313 (sorovar 4b),  
*Listeria monocytogenes* 1/2a isolada de lingüiça suína tipo frescal.

#### 2.1.2 Alimentos

Queijo do tipo Minas Frescal: Entende-se por Queijo Minas Frescal, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É classificado com um queijo semi-gordo, de muito alta umidade, a ser consumido fresco. No processo de elaboração, é obtida uma massa

coalhada, dessorada, não prensada, salgada e não maturada; acondicionado em embalagem plástica ou em envases bromatologicamente aptos. Possui consistência branda, macia; cor esbranquiçada; sabor suave ou levemente ácido, com forma cilíndrica e peso variando de 0,3 a 5kg (BRASIL, 1997).

Queijo do tipo Coalho: Entende-se por queijo de coalho, o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas. É classificado como um queijo de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida e apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0% e 60,0%. As características distintivas do processo de elaboração é devido a coagulação em torno de 40 minutos, corte e mexedura da massa, remoção parcial do soro, aquecimento da massa com água quente ou vapor indireto até obtenção de massa semicozida (até 45°C) ou cozida (entre 45° e 55°C), adição de sal (cloreto de sódio) à massa, se for o caso, prensagem, secagem, embalagem e estocagem em temperatura média de 10 - 12°C normalmente até 10 (dez) dias. Esse queijo poderá ser também elaborado a partir de massa crua (sem aquecimento). Apresenta consistência semidura, elástica; cor branco amarelado uniforme; sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado; com crosta fina, sem trinca, não sendo usual a formação de casca bem definida (BRASIL, 2001a).

### 2.1.3 Tratamentos com Antimicrobianos

Tratamento A: Solução de lactato de sódio a 2% (p/v) em combinação com solução de acetato de sódio a 0,25% (p/v);

Tratamento B: Solução de propionato de sódio a 2% (p/v) em combinação com solução de acetato de sódio a 0,25% (p/v).

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Local do Estudo

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia.

### 2.2.2 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo transversal de caráter exploratório e experimental.

### 2.2.3 Amostragem e Tratamento das Amostras

Amostras de queijos dos tipos Minas Frescal e Coalho foram adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Salvador/BA, com selo de inspeção estadual (S.I.E) ou federal (S.I.F.). As amostras foram colhidas nas suas embalagens originais sendo obtido pelo menos 200 g do material. Essa amostragem foi repetida por três vezes para cada tipo de queijo.

As amostras foram transportadas para o laboratório em recipientes isotérmicos com gelo reciclável, mantidas sob refrigeração e submetidas às análises no mesmo dia. A superfície superior dos queijos (casca) foi retirada assepticamente em capela de fluxo laminar (LABCONCO modelo 36210 classe BII) e fatiada com auxílio de garfos e facas estéreis, em pequenos pedaços, que foram transferidos para placas de Petri estéreis, pesando aproximadamente 30 gramas cada amostra.

### 2.2.4 Preparo da Suspensão Bacteriana de *Listeria monocytogenes*

Culturas bacterianas de *L. monocytogenes* mantidas em agar infusão de cérebro e coração (BHI) (DIFCO) semi sólido (0,5% de agar), sob refrigeração, foram ativadas em caldo tripticase de soja suplementado com 0,5% de extrato de levedura (TSB-YE) (DIFCO) a 35 °C por 24 horas, sob agitação em uma incubadora do tipo *shaker* (CIENTEC, modelo CT 712, Brasil) a 150 rpm. Após a ativação, 1,0 mL de cada cultura ativa de *L. monocytogenes* foi adicionado separadamente na superfície de duas placas contendo agar tripticase de soja TSA-YE suplementado com 0,5% de extrato de levedura (DIFCO) (0,5 mL em cada placa), espalhando-se o inóculo com auxílio de alça de Drigalsky estéril e incubando-se as placas a 35 °C por 24 horas. Posteriormente, as superfícies das placas foram lavadas com 2 mL de água peptonada tamponada (1 mL para cada placa) também com o auxílio de alça de Drigalsky, transferindo-se em seguida a suspensão obtida para tubos do tipo eppendorf estéreis (VALADARES, 2000). A partir dessa suspensão foram realizadas

diluições em tubos de ensaio contendo 900 µL de água peptonada tamponada, que foram então inoculadas em duplicata na superfície de placas contendo Ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam (LPM) (DIFCO) modificado contendo 0,5% de esculina e 0,1 % de citrato férrico amoniacal e suplementado com o antibiótico moxalactam. Após incubação a 35 °C/ 48 horas, placas contendo entre 30 e 300 colônias foram selecionadas para contagem das células viáveis das duas cepas do microrganismo inoculadas e os resultados expressos como Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL). Este experimento foi repetido por três vezes e a média das contagens foi expressa como UFC/mL.

#### 2.2.5 Ensaio para Avaliar a Eficácia dos Sais de Ácidos Orgânicos de Cadeia Curta

*-Preparo das amostras de queijos:* Pedacos de queijo obtidos assepticamente em cabine de fluxo laminar foram distribuídos em seis placas de Petri estéreis, em área aproximada de 65 cm<sup>2</sup> em cada placa (c.a. de 30 gramas de amostra). Dessas seis placas, três foram identificadas como tempo (dia) zero do experimento, ou seja, o dia inicial a contar a vida de prateleira desse queijo sob refrigeração. As outras três placas foram identificadas como tempo (dia) 7, relativo à vida de prateleira do queijo após aberto, sob refrigeração, transcrita nos rótulos das amostras de queijo obtidos nos estabelecimentos comerciais.

Repetiu-se o experimento três vezes para cada tipo de queijo (Minas Frescal e Coalho).

*-Preparo das amostras controle para *Listeria monocytogenes*:* Amostras de queijo anteriormente pesadas (30 g cada), correspondentes a duas placas de Petri, foram transferidas para sacos plásticos estéreis, sendo uma delas destinada ao controle para *L. monocytogenes* no produto no tempo zero e outra para o tempo 7, sob refrigeração. Em seguida, foi adicionado 1 mL da mistura dos inóculos de *L. monocytogenes* previamente obtidos (item 2.2.4), sendo 500 µL da suspensão bacteriana de *L. monocytogenes* sorovar 1/2a (população aproximada de  $6,2 \times 10^5$  UFC/mL) e 500 µL da suspensão bacteriana de *L. monocytogenes* Scott A, sorovar 4b (população aproximada de  $3,5 \times 10^5$  UFC/mL) em cada porção do alimento.

As amostras inoculadas foram massageadas com as mãos, para permitir uma distribuição uniforme da bactéria e, a seguir, deixadas por trinta minutos em capela de fluxo laminar para permitir a adesão bacteriana. Após esta etapa, a amostra identificada como tempo 7 foi armazenada sob refrigeração, para a contagem da bactéria no sétimo dia. À amostra do tempo zero foram adicionados 270 mL de água peptonada tamponada com 0,01% de tween 80 (SYNTH), homogeneizada por 2 min em homogeneizador do tipo *Stomacher* (ITR modelo 1204, serie 126, Brasil, 240bpm), obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ . Foram feitas diluições decimais subseqüentes até  $10^{-4}$ , usando-se 100  $\mu$ L da amostra homogeneizada e 900  $\mu$ L de água peptonada tamponada. Em seguida, foram inoculadas, em duplicata, as quatro diluições preparadas em placas contendo agar LPM modificado. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas e a contagem das células viáveis de *L. monocytogenes* foram realizadas em placas contendo entre 30 e 300 UFC. A média das contagens foi expressa como UFC/g.

#### *Tratamento das amostras:*

Tratamento A: Solução de lactato de sódio a 2% (p/v) em combinação com solução de acetato de sódio a 0,25% (p/v):

Amostras provenientes de outras duas placas de Petri, uma para o dia zero e outra para o dia 7, foram pesadas (30 g cada) e transferidas para sacos plásticos estéreis. Em seguida, foi adicionado 1 mL dos inóculos previamente preparados de *L. monocytogenes*, 500  $\mu$ l do sorovar 1/2a e 500  $\mu$ l do sorovar 4b (população aproximada de  $10^5$  UFC/mL). As amostras inoculadas foram massageadas com as mãos, para permitir uma distribuição uniforme da bactéria no alimento e, em seguida, foram deixadas por trinta minutos em capela de fluxo laminar, para permitir a adesão bacteriana. Após esta etapa, com ajuda de proveta estéril foi adicionada a combinação de 50 mL de solução de lactato de sódio a 2% (p/v) e 50mL de solução de acetato de sódio a 0,25% (p/v) a cada amostra. Deixou-se agir por 20 minutos para permitir a ação dos ácidos e, em seguida, drenou-se o excesso de líquido. Após o tratamento com os ácidos e drenagem da solução, a amostra identificada como tempo 7 foi colocada sob refrigeração para a contagem da bactéria no sétimo dia. À amostra do tempo zero foram adicionados 270 mL de

água peptonada tamponada adicionada de 0,01% de tween 80 (SYNTH), homogeneizada por 2 min em homogeneizador do tipo *Stomacher*, obtendo-se assim a primeira diluição. Posteriormente, foram preparadas diluições decimais subseqüentes até  $10^{-4}$ , usando-se 100  $\mu$ L da amostra homogeneizada e 900  $\mu$ L de água peptonada tamponada e, em seguida, essas diluições foram inoculadas, em duplicata, em placas contendo agar LPM modificado. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas e as contagens das células viáveis de *L. monocytogenes* foram realizadas em placas contendo entre 30 e 300 UFC. A média das contagens foi expressa como UFC/g.

Tratamento B: Solução de propionato de sódio a 2% (p/v) em combinação com solução de acetato de sódio a 0,25% (p/v):

O mesmo procedimento mencionado acima foi seguido, substituindo-se a solução do tratamento A pela combinação de 50 mL de solução de propionato de sódio a 2% (p/v) e 50mL de solução de acetato de sódio a 0,25% (p/v).

#### 2.2.6 Análise Estatística

Os tratamentos das amostras com seus respectivos controles, foram realizados por três vezes, sendo as contagens das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) obtidas sempre em duplicata e expressas como valor médio das contagens. Todas as contagens obtidas foram convertidas em logaritmos e o número de reduções decimais (RD) foi calculado através da diferença entre a contagem inicial das células (controle *Listeria*) e a contagem final obtida após os tratamentos com os sais de ácidos orgânicos, nos tempos zero e sete dias, sob refrigeração.

O experimento foi conduzido em esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas os dois tratamentos (amostras de queijos inoculados artificialmente com *L. monocytogenes* e amostras inoculadas com o patógeno e posteriormente adicionadas do tratamento antimicrobiano) e, nas subparcelas, dois períodos (tempo zero e 7). Para a avaliação estatística foram utilizados a análise de variância e o teste de Tukey para determinar a existência de diferenças

estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores médios das contagens microbianas obtidas após os tratamentos.

Para execução das análises estatísticas, utilizou-se o software ASSISTAT (versão 7.6 beta) (2011).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Obtenção do Inóculo de *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b

O valor médio das contagens obtidas no preparo da suspensão de *Listeria monocytogenes* pode ser observado na Tabela 1. A população do inóculo bacteriano de *L. monocytogenes* 1/2a obtida foi de  $6,2 \times 10^9$  UFC/mL e a de *L. monocytogenes* Scott A, sorovar 4b, foi de  $3,5 \times 10^9$  UFC/mL (Tabela 1) e essas populações foram posteriormente diluídas até  $6,2 \times 10^5$  UFC/mL e  $3,5 \times 10^5$  UFC/mL, respectivamente, com água peptonada tamponada, para a realização dos experimentos. A escolha da população do inóculo (c.a.  $10^5$  UFC/mL) para contaminação artificial do queijos foi visando a obtenção de uma população final de *L. monocytogenes* na amostra (após a adesão) de pelo menos  $10^3$  UFC/g.

**TABELA 1.** População de *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, obtida no preparo das suspensões bacterianas.

Ensaio	<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a		<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	
	UFC/mL	Log UFC/mL	UFC/mL	Log UFC/mL
1	$8,3 \times 10^9$	9,9	$2,7 \times 10^9$	9,4
2	$5,1 \times 10^9$	9,7	$3,7 \times 10^9$	9,5
3	$5,2 \times 10^9$	9,7	$4,1 \times 10^9$	9,6
<b>Média<sup>a</sup></b>	<b><math>6,2 \times 10^9 \pm 1,8</math></b>	<b><math>9,8 \pm 0,1</math></b>	<b><math>3,5 \times 10^9 \pm 0,7</math></b>	<b><math>9,5 \pm 0,1</math></b>

<sup>a</sup>  $\pm$  desvio-padrão

### 3.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS SAIS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DE CADEIA CURTA SOBRE CÉLULAS DE *Listeria monocytogenes* INOCULADAS EM AMOSTRAS DE QUEIJOS

#### 3.2.1 Amostras de Queijo Controle para Células de *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b

Os valores obtidos para a população de *L. monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, inoculada artificialmente em 30 g das amostras dos queijos tipo Minas Frescal e Coalho, nos tempos (dias) zero e 7, estão demonstrados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

**TABELA 2.** População de *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, após a inoculação das amostras de queijo tipo Minas Frescal, nos tempos zero e sete dias.

<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>a</sup>	Tempo (Dias)				
	Experimento	Zero		Sete	
		UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g
1	8,6 x 10 <sup>5</sup>	5,9	3,8 x 10 <sup>6</sup>	6,6	
2	9,7 x 10 <sup>5</sup>	6,0	3,3 x 10 <sup>6</sup>	6,5	
3	1,4 x 10 <sup>5</sup>	5,1	3,1 x 10 <sup>6</sup>	6,5	
<b>Média<sup>b</sup></b>	<b>6,6 x 10<sup>5</sup> ± 4,5</b>	<b>5,7 ± 0,5</b>	<b>3,4 x 10<sup>6</sup> ± 0,3</b>	<b>6,5 ± 0,05</b>	

<sup>a</sup> População do inóculo: aproximadamente 5,7 log UFC/mL.

<sup>b</sup> ± desvio-padrão

Os valores obtidos na população de *L. monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, demonstram que o período de 30 minutos foi suficiente para adesão completa da bactéria, tanto para o queijo do tipo Minas Frescal quanto para o do tipo Coalho (Tabelas 2 e 3). Porém, após sete dias de refrigeração das amostras, observou-se um aumento da população de *L. monocytogenes* de 5,7 log UFC/g para 6,5 log UFC/g nas amostras do queijo Minas Frescal e de 5,4 log UFC/g para 6,5 log UFC/g nas do queijo Coalho.

**TABELA 3.** População de *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, após a inoculação das amostras de queijo tipo Coalho, nos tempos zero e sete dias.

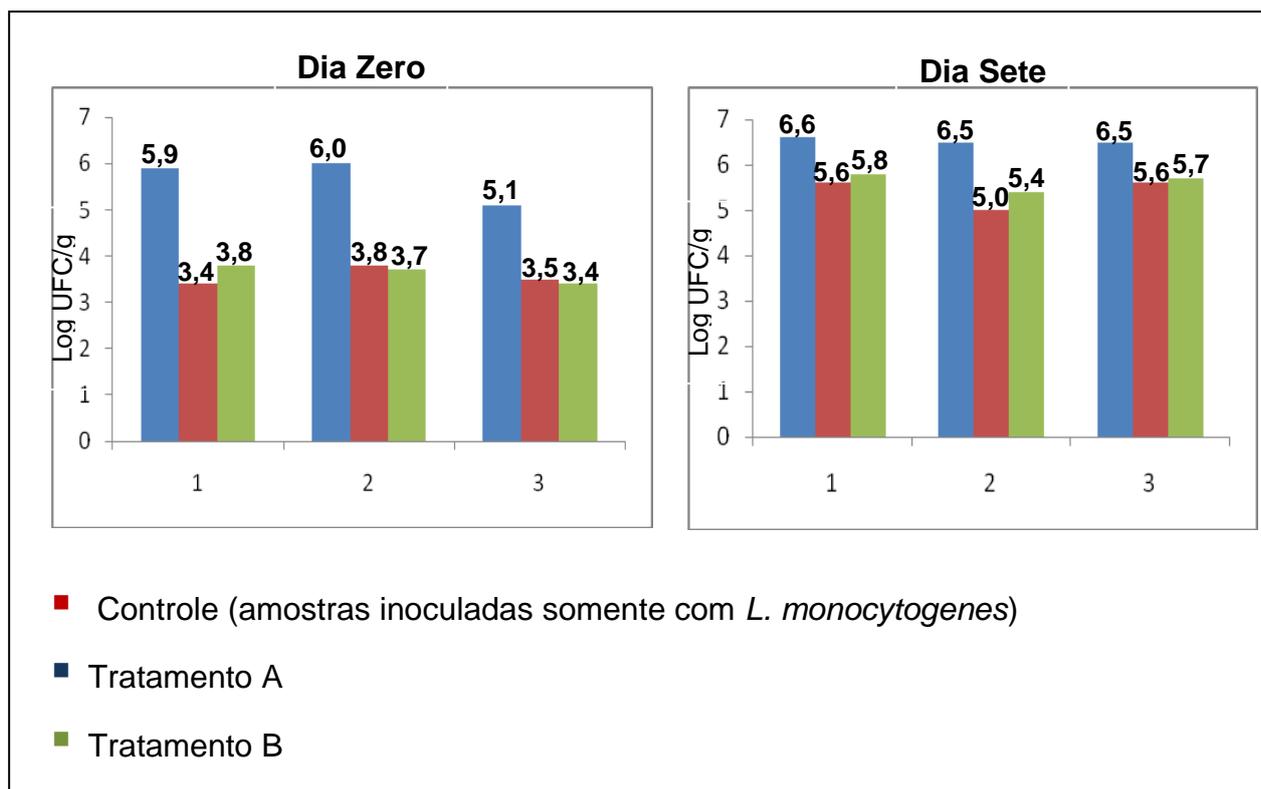
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>a</sup>	Tempo (Dias)			
	Zero		Sete	
	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g
Experimento				
1	1,4 x 10 <sup>5</sup>	5,1	3,2 x 10 <sup>6</sup>	6,5
2	3,6 x 10 <sup>5</sup>	5,6	3,6 x 10 <sup>6</sup>	6,6
3	3,6 x 10 <sup>5</sup>	5,6	2,8 x 10 <sup>6</sup>	6,4
<b>Média<sup>b</sup></b>	<b>2,9 x 10<sup>5</sup> ± 1,3</b>	<b>5,4 ± 0,3</b>	<b>3,2 x 10<sup>6</sup> ± 0,4</b>	<b>6,5 ± 0,1</b>

<sup>a</sup> População do inóculo: aproximadamente 5,7 log UFC/mL.

<sup>b</sup> ±desvio-padrão

### 3.2.2 Tratamentos das Amostras de Queijos Inoculadas Artificialmente com *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, com Sais de Ácidos Orgânicos de Cadeia Curta

Os resultados da Figura 1 demonstram o efeito da combinação das soluções de lactato de sódio a 2% (p/v) com acetato de sódio a 0,25% (p/v) (Tratamento A) e propionato de sódio a 2% (p/v) com acetato de sódio a 0,25% (p/v) (Tratamento B), no controle da contaminação por *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal no tempo zero e sete dias em refrigeração. Verifica-se que no primeiro experimento, no tempo zero, o tratamento A reduziu em 2,5 ciclos logarítmicos o número de células viáveis de *L. monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, inoculadas nas amostras do queijo. No segundo experimento observa-se comportamento semelhante ao primeiro, ou seja, no tempo zero a redução foi de 2,2 ciclos log (6,0 log UFC/g para 3,8 log UFC/g) e no terceiro experimento, a redução observada foi inferior à dos outros dois experimentos, ou seja, 1,6 ciclos log, com contagem inicial de *L. monocytogenes* na amostra controle na ordem de 5,1 log UFC/g e na amostra submetida ao tratamento de 3,5 log UFC/g.

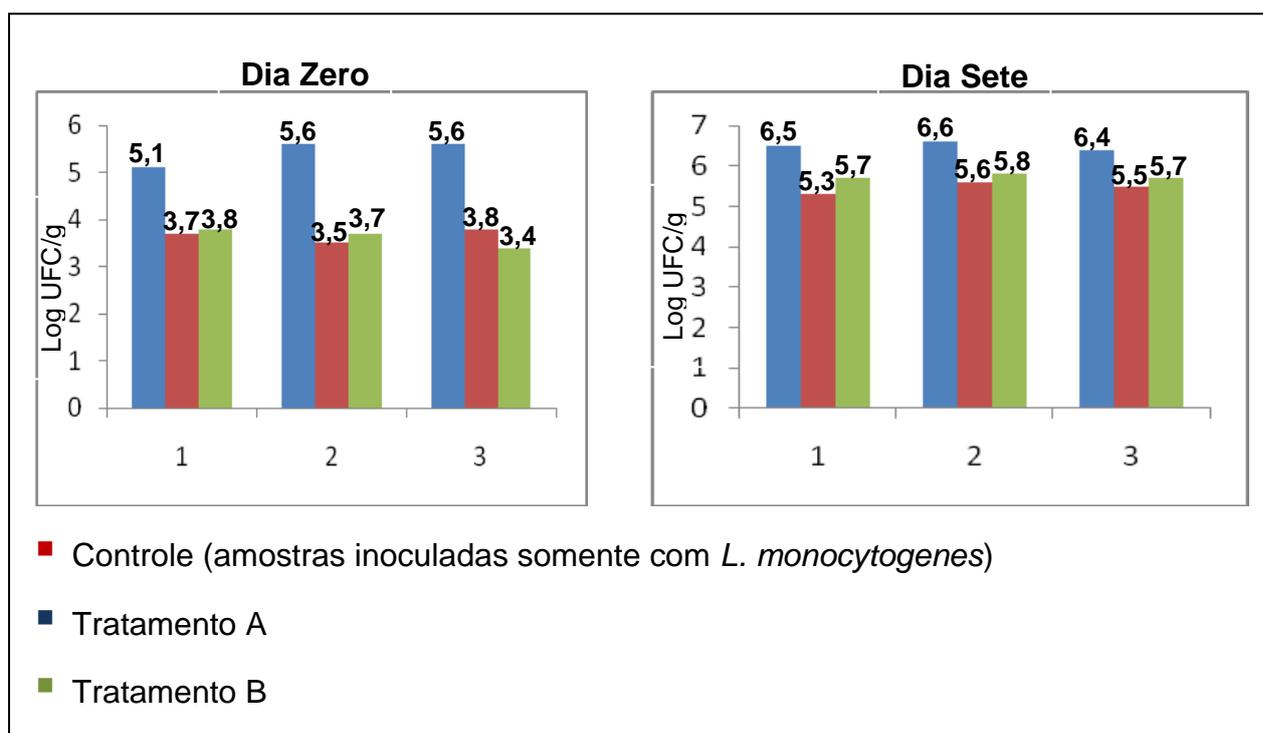


**FIGURA 1.** Efeito dos tratamentos com ácidos orgânicos no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo do tipo Minas Frescal, no dia zero e após sete dias em armazenamento a 10°C.

As amostras de queijo Minas submetidas ao tratamento B, propionato de sódio e acetato de sódio, também sofreram redução na população bacteriana inoculada, ou seja, uma RD média igual a 2,0 ciclos log, semelhante à observada com o Tratamento A. Dessa forma, observa-se no primeiro experimento uma diminuição em 2,1 ciclos logarítmicos no número de células viáveis de *L. monocytogenes*, no segundo experimento observa-se comportamento semelhante em relação ao primeiro, com uma RD um pouco melhor, ou seja, 2,3 ciclos log (6,0 log UFC/g para 3,7 log UFC/g) e no 3º experimento a RD obtida foi inferior, ou seja, 1,7 ciclos log.

Nos experimentos conduzidos com queijo Minas após 7 dias de armazenamento sob refrigeração, verifica-se um aumento na população de *L. monocytogenes* inoculada nas amostras (controle) e, após os tratamentos A e B, uma RD pouco expressiva, com valores médios de 1,1 para o tratamento A e 0,9 para o tratamento B.

Na Figura 2, pode-se perceber que experimentos conduzidos com o queijo do tipo Coalho, resultados semelhantes aos do queijo tipo Minas frescal foram encontrados, porém com valor médio um pouco menor para a redução (RD) na população bacteriana obtida nas amostras do queijo após o tratamento A, no tempo zero.



**FIGURA 2.** Efeito dos tratamentos com ácidos orgânicos no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo do tipo Coalho, no dia zero e após sete dias em armazenamento a 10°C.

Os resultados demonstram que no dia zero, o tratamento A conseguiu reduzir a população de *Listeria* em 1,4 ciclos log (5,1 log UFC/g para 3,7 log UFC/g) no primeiro experimento, enquanto que no segundo experimento a RD foi melhor, ou seja, 2,1 ciclos log (5,6 log UFC/g para 3,5 log UFC/g). No 3º experimento o tratamento A reduziu em 1,8 ciclos logarítmicos o número de células viáveis de *L. monocytogenes*, RD superior a obtida no 1º experimento, mas inferior à do 2º experimento.

Com relação ao tratamento B, empregando o ácido propiônico e ácido acético, verificou-se que a RD média obtida foi de 2 ciclos logarítmico, valor esse

superior ao encontrado para o tratamento A, conduzido com lactato de sódio e acetato de sódio.

Comparando-se os dois tipos de queijos, nota-se que ambos os tratamentos levaram a RD similares na população de *Listeria* no dia zero dos experimentos.

Após os tratamentos A e B nas amostras do queijo do tipo Coalho, em sete dias de armazenamento a 10 °C, observa-se que a melhor RD obtida após o tratamento A, foi de apenas 1,2 ciclos log (6,5 log UFC/g para 5,3 log UFC/g). O valor médio alcançado foi de 1,0 ciclo log, similar àquele encontrado para o queijo Minas Frescal, nesse mesmo tempo de armazenamento das amostras, ou seja, 1,1 ciclo log. Com o tratamento B, utilizando propionato e acetato de sódio, em sete dias de armazenamento, as RD alcançadas ainda foram menores, com valor médio igual a 0,8 ciclo log, a menor redução na população de *Listeria* encontrada nos experimentos conduzidos.

Após 7 dias de tratamento sob refrigeração, observa-se que o tratamento das amostras dos dois tipos de queijos com a combinação das soluções de lactato de sódio a 2% (p/v) e acetato de sódio a 0,25% (p/v) culminou numa redução da população bacteriana melhor no dia zero. Esses resultados podem ser devidos à adaptação e tolerância da bactéria a pH mais baixos e também ao seu caráter psicrotrófico. Ainda é importante mencionar que a população bacteriana na amostra (controle) estava relativamente alta, valores médios de 5,7 e 5,4 log UFC, para o queijo Minas e Coalho, respectivamente, o que demonstra que a adesão bacteriana foi completa, fato esse não esperado. Dessa forma, essa alta população do microrganismo pode ter dificultado a ação dos ácidos orgânicos.

Os sais de ácidos orgânicos tais como lactato de sódio ou lactato de potássio e diacetato de sódio são extensivamente usados como antimicrobianos em produtos cárneos e de aves (SERDENGECTI; YILDIRIMI; GOKOGLU, 2006; SHELEF; YANG, 1991; WEAVER; SHELEF, 1993; HARMAYANI; SOFOS; SCHMIDT, 1993). Além disso, a adição de ácido lático tem demonstrado produzir um sinergismo antimicrobiano potencial quando usado com orégano e oxicoco contra *L. monocytogenes* cultivada em caldo (LIN; LABBE; SHETTY, 2004).

De acordo com Maks et al. (2010), atualmente o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos permite a adição de lactato de sódio ou potássio até o nível de 4,8% e diacetato de sódio até 0,25% às formulações de produtos de

carnes e aves para inibir o crescimento microbiano. Outros tratamentos com antimicrobianos tais como ácidos orgânicos aplicados por *spray* ou por imersão também reduzem ou inibem o crescimento de *L. monocytogenes* em carnes prontas para o consumo (UHART; MAKS; RAVISHANKAR, 2004; SAMELIS et al., 2001 citados por MAKS et al., 2010).

No Brasil, o Ministério da Agricultura autorizou em 2001 o uso do ácido láctico e do ácido peracético para descontaminação de ovos e carcaças de aves (BRASIL, 2001).

Estudo conduzido por Stekelenburg e Kant-Muermans (2001) com produtos de presunto cozido curado, produzidos de acordo com uma receita padrão para presunto cozido, e com a adição de vários níveis de lactato de sódio, diacetato de sódio ou citrato de sódio tamponado, avaliou a qualidade sensorial e o crescimento de *Lactobacillus curvatus* e *Listeria monocytogenes*. Após embalagem a vácuo dos produtos e estocagem a 4 °C por até 40 dias, os autores encontraram pequenas diferenças em relação a aparência, coloração interna, estrutura e firmeza, e relataram que a adição de diacetato de sódio 0,2% propiciou um efeito negativo no odor e sabor do produto de presunto. Ainda segundo os autores, *L. monocytogenes* foi melhor inibida pela adição de lactato de sódio, mas também pela adição de diacetato de sódio a 0,2%. Por outro lado, o crescimento de *L. monocytogenes* foi estimulado pela adição de citrato de sódio tamponado.

Segundo Mbandi e Shelef (2001) as atividades antimicrobianas de lactato de sódio (SL) e acetato de sódio (SA) estão bem documentadas mas há pouca informação sobre os efeitos de suas combinações ou da combinação de SL e diacetato de sódio (SDA) na sobrevivência e crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* em carnes. Os autores investigaram os efeitos de SL (1,8 e 2,5%), SDA (0,1 e 0,2%) ou SA (0,2) e suas combinações no comportamento de *L. monocytogenes* e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em carne bovina moída estéril (pH 6,3, umidade 79%) durante armazenamento a 5 e 10 °C. Segundo os autores, embora *L. monocytogenes* crescesse mais rápido que *Salmonella enterica* nas amostras controle a 10 °C o número de ambos os patógenos aumentou de 3,5 à aproximadamente 8,0 log UFC/g após 20 dias. Os autores relataram que o lactato de sódio (SL) a 1,8% diminuiu a velocidade de crescimento de *L. monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis, enquanto o diacetato de sódio (SDA) a 0,2% foi mais efetivo

que o SL na diminuição da velocidade de crescimento de *L. monocytogenes* e provocou o declínio de mais de 1 log UFC/g nos números iniciais de *Salmonella* Enteritidis durante armazenamento por 25 dias a 10 °C. Os autores afirmaram que foi observado sinergismo nas combinações de SL e SDA e que as combinações de SL 2,5% e SDA 0,2% foram bacteriostáticas para *L. monocytogenes* e bactericidas para *Salmonella* Enteritidis após 20 dias a 10 °C; a 5 °C um efeito listeriostático foi produzido por SL 1,8% + SDA 0,1%, enquanto números de *Salmonella* Enteritidis foram menores que 10 células/g após refrigeração por 30 dias. Finalmente, os autores afirmaram que embora SA fosse consistentemente e significativamente menos inibitório do que SDA suas misturas com SL também mostraram atividade sinérgica contra ambos patógenos.

Os resultados do presente estudo também demonstram o aumento da população de *L. monocytogenes* nas amostras dos dois tipos de queijos, Minas Frescal e Coalho, após 7 dias a 10 °C, mesmo em se tratando daquelas adicionadas de lactato de sódio e acetato de sódio, ou propionato de sódio e acetato de sódio.

Ainda, analisando os resultados encontrados por Mbandi e Shelef (2001) denota-se que enquanto a combinação dos sais lactato de sódio e diacetato de sódio apresentou efeito bactericida sobre *Salmonella* Enteritidis, para *L. monocytogenes* este efeito foi apenas bacteriostático, demonstrando a melhor resistência da bactéria aos ácidos.

Lappe et al. (2009) investigaram a habilidade de uma bacteriocina com EDTA e lactato de sódio para inibir o crescimento de *Salmonella* Enteritidis cultivada em caldo BHI. Segundo os autores, todos os tratamentos testados, sozinhos ou em combinação, inibiram significativamente o crescimento da bactéria, sendo que o lactato de sódio sozinho, na concentração de 200 mmol/L levou a uma redução de 1,8 ciclos log.

### 3.3 Análise Estatística

De acordo com os dados encontrados, relacionados à sobrevivência de *L. monocytogenes* em função da adição ou não dos tratamentos antimicrobianos, englobando os dois períodos (tempo zero e sete), apresentados nas Tabelas 4 e 5, pode-se observar que houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o uso ou não de

tratamento, nos dois tipos de queijo; porém, não houve diferença entre os tratamentos antimicrobianos utilizados.

**TABELA 4.** Valores médios das contagens de *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b (log de UFC/g), nas amostras de queijo Minas Frescal em função da adição ou não dos tratamentos antimicrobianos, nos tempos zero e sete dias.

<i>Listeria monocytogenes</i> (Log <sub>10</sub> UFC/g)		
Tratamento	0 dia	7 dias
Sem tratamento	5,7 a*	6,5 a
Tratamento A <sup>a</sup>	3,6 b	5,4 b
Tratamento B <sup>b</sup>	3,6 b	5,6 b

<sup>a</sup>Solução de lactato de sódio a 2% (p/v) em combinação com solução de acetato de sódio a 0,25% (p/v)

<sup>b</sup>Solução de propionato de sódio a 2% (p/v) em combinação com solução de acetato de sódio a 0,25% (p/v)

\* Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

**TABELA 5.** Valores médios das contagens de *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b (log de UFC/g), nas amostras de queijo tipo Coalho em função da adição ou não dos tratamentos antimicrobianos, nos tempos zero e sete dias.

<i>Listeria monocytogenes</i> (Log <sub>10</sub> UFC/g)		
Tratamento	0 dia	7 dias
Sem tratamento	5,4 a*	6,5 a
Tratamento A <sup>a</sup>	3,7 b	5,5 b
Tratamento B <sup>b</sup>	3,6 b	5,7 b

<sup>a</sup>Solução de lactato de sódio a 2% (p/v) em combinação com solução de acetato de sódio a 0,25% (p/v)

<sup>b</sup>Solução de propionato de sódio a 2% (p/v) em combinação com solução de acetato de sódio a 0,25% (p/v)

\* Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Através da análise da Tabela 4, observa-se que houve redução média (RD) de 2,1 ciclos log nas contagens de células viáveis nas amostras de queijo Minas Frescal contaminadas artificialmente com *L. monocytogenes* e posteriormente submetidas aos tratamentos antimicrobianos, no tempo zero. Após sete dias em

refrigeração, essa redução foi de apenas 1,1 ciclo log para o Tratamento A e 0,9 ciclo log para o Tratamento B.

No queijo do tipo Coalho a aplicação do Tratamento A conseguiu reduzir em cerca de 1,7 ciclos log a população de *L. monocytogenes*, no tempo 0; e para o Tratamento B a RD observada foi de 1,8 ciclo log. Após sete dias sob refrigeração, a redução foi menor, de 1,0 ciclo log para as amostras submetidas ao Tratamento A e 0,8 ciclo log para aquelas submetidas ao Tratamento B (TABELA 5).

Os resultados demonstram que a aplicação dos sais de ácidos orgânicos de cadeia curta nas concentrações e combinações utilizadas foram eficazes na redução dos níveis de contaminação por *L. monocytogenes* nas amostras dos dois tipos de queijos. A diferença estatística observada nas contagens de células viáveis da bactéria nas amostras tratadas nos tempos zero e sete evidencia o caráter psicrotrófico da bactéria em estudo.

Ainda, através dos resultados das tabelas 8 e 9, pode-se perceber uma RD mais significativa para o tempo 0 em relação ao tempo sete, para os dois tipos de queijos e os dois tratamentos utilizados. Entretanto, a análise estatística indica a continuidade da ação dos tratamentos antimicrobianos na redução dos níveis de contaminação por *L. monocytogenes* mesmo em temperaturas de refrigeração, sem contudo haver diferença entre eles.

#### 4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados alcançados neste estudo conclui-se que as combinações dos sais de ácidos orgânicos de cadeia curta utilizados, lactato de sódio a 2% (p/v) com acetato de sódio a 0,25% (p/v) e propionato de sódio a 2% (p/v) com acetato de sódio a 0,25% (p/v), foram eficazes no controle da contaminação por células de *Listeria monocytogenes* inoculadas em queijos de massa macia, Minas Frescal e Coalho, nos tempos zero e sete do experimento. Entretanto, após sete dias de armazenamento sob refrigeração a eficácia dos tratamentos empregados foi menos expressiva, devido, provavelmente à proliferação do patógeno (caráter psicrotrófico) e à sua adaptação e tolerância a pH mais baixos. Dessa forma, estudos futuros para verificar a eficácia dos ácidos orgânicos

orgânicos de cadeia curta na erradicação de *Listeria monocytogenes* em queijos de massa macia devem ser conduzidos para verificar a ação dos mesmos em populações mais baixas do microrganismo, ou combinação desses tratamentos com outras substâncias naturais obtidas a partir de alimentos.

## REFERÊNCIAS

AHAMAD, N.; MARTH, E. H. Acid-injury of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 26–29, 1990.

BRASIL. Portaria nº 352 de 4 de setembro de 1997. Aprovar o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 1, p. 19684, 8 set. 1997.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30 de 26 de julho de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 1, p. 14-15,16 julho 2001a.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução de Diretoria Colegiada n. 7, de 2 de janeiro de 2001. Aprovar a extensão de uso do Ácido Lático (INS 270) como coadjuvante de tecnologia, na função de agente de controle de microrganismos na lavagem de ovos, carcaças ou partes de animais de abate açougue em quantidade suficiente para obter o efeito desejado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF. 2001b.

CARNICEL, F. A.; PERESI, J. T. M.; COELHO, A. R.; GONÇALVES, T. M. V.; HOFFMANN, F. L. Avaliação da ação antimicrobiana *in vitro* de propionato de sódio sobre leveduras isoladas de ricotas. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 129, p. 76-81, 2005.

CONNER, D. E.; SCOTT, V. N.; BERNARD, D. T. Growth inhibition and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 652–655, 1990.

DAVIS, M. J.; COOTE, P. J.; O'BYRNE, C. P. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth phase-dependent acid resistance. **Microbiology**, v.142, p. 2975–2982, 1996.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. **Microbiology Review**, v. 55, p. 476–511, 1991.

FLEMING, D. W.; COCHI, S. L.; MACDONALD, K. L.; BRONDUM, J.; HAYES, P. S.; PLIKAYTIS, B. D.; HOLMES, M. B.; AUDURIER, A.; BROOME, C. V.; REINGOLD, A. L. Pasteurized milk as vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 404–407. 1985.

HARMAYANI, E.; SOFOS, J. N.; SCHMIDT, G. R. Fate of *Listeria monocytogenes* in raw and cooked ground beef with meat processing additives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 18, p. 223–232. 1993.

JAMES, S. M.; FANNING, S. L.; AGREE, B. A.; HALL, B.; PARKER, E.; VOGT, J.; RUN, G.; WILLIAMS, J.; LIEB, L.; SALMINEN, C.; PRENDERGAST, T.; WALKER, S.

J.; ARCHER, P.; BANKS, J. G. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 157–162, 1990.

KROLL, R. G.; PATCHETT, R. A. Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 14, p. 224–227, 1992.

LAPPE, R.; MOTTA, A. S.; SANT'ANNA, V.; BRANDELLI, A. Inhibition of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A, EDTA and sodium lactate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 312–316, 2009.

LIN, Y. T.; LABBE, R. G., SHETTY, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems using oregano and cranberry synergies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5672–5678. 2004.

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

MBANDI, E.; SHELEF, L. A. Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enderitidis in meat by combinations of sodium lactate and diacetate. **Journal of Food Protection**, v.64, n.5, p. 640-4, 2001.

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

SCHLECH, W. F.; LAVIGNE, P. M; BORTOLUSSI, R. A.; ALLEN, A. C.; HALDANE, E. V.; WORT, A. J.; HIGHTOWER, A. W.; JOHNSON, S. E.; KING, S. H.; NICHOLLS, E. S.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. **New England Journal of Medicine**, v. 308, p.203–206, 1983.

SCHLYTER, J. H.; GLASS, K. A.; LOEFFELHOLZ, J.; DEGNAN, A. J.; LUCHANSKY, J. B. The effects of diacetate with nitrite, lactate, or pediocin on the viability of *Listeria monocytogenes* in turkey slurries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 19, p. 271–281. 1993.

SERDENGECTI, N.; YILDIRIMI, I.; GOKOGLU, N. Effects of sodium lactate, sodium acetate and sodium diacetate on microbiological quality of vacuum-packed beef during refrigerated storage. **Journal of Food Safety**, v. 26, p. 62–71, 2006.

SHELEF, L. A.; YANG, Q. Growth suppression of *Listeria monocytogenes* by lactates in broth, chicken, and beef. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 283–287. 1991.

SORRELLS, K. M.; ENIGL, D. C.; HATFIELD, J. R. Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. **J. Food. Prot.**, v. 52, p. 571–573, 1989.

STEKELENBURG, F. K.; KANT-MUERMANS, M. L. T. Effects of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sensory quality and development of a

strain of *Lactobacillus curvatus* and *Listeria monocytogenes*. **International Journal Food Microbiology**, v. 66, p. 197–203, 2001.

UHART, M.; MAKS, N.; RAVISHANKAR, S. Effect of spices on growth and survival of *Salmonella Typhimurium* DT 104 in ground beef stored at 4 and 8°C. **Journal of Food Safety**, v.26, p.115-125, 2006.

UNDA, J. R.; MOLINS, R. A.; WALKER, H. W. *Clostridium sporogenes* and *Listeria monocytogenes*: survival and inhibition in microwave-ready beef roasts containing selected antimicrobials. **Journal of Food Science**, v. 56, p.198–205, 1991.

VALADARES, G. F. **Detecção do fator de colonização CS31A em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia e sua associação com fatores de virulência**. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, 2000. 81f.

WALKER, S. J.; ARCHER, P.; BANKS, J. G. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 68, p. 157-162. 1990.

WEAVER, R. A.; SHELEF, L. A. Antilisterial activity of sodium potassium or calcium lactate in pork liver sausage. **Journal of Food Safety**, v. 13, p. 133–146. 1993.

WERNER, S. B.; CHIN, J. Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese. **California. Morb. Mortal. Wkly Rep.**, v. 34, p. 357–359, 1985.

WONG, A. C. L. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2765–2770, 1998.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS:

- O desenvolvimento deste estudo traz uma contribuição sobre o uso do bacteriófago P100 para o controle da contaminação por *Listeria monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, em queijos de massa macia (Minas Frescal e Coalho).

- O estudo também corrobora com a afirmativa de que a aplicação de sais de ácidos orgânicos de cadeia curta pode ser uma alternativa viável no controle da contaminação por *Listeria monocytogenes* em queijos de massa macia (Minas Frescal e Coalho).

- O estudo traz uma valiosa contribuição, pois é pioneiro no Brasil, ao utilizar o bacteriófago P100 e sais de ácidos orgânicos em alimentos típicos brasileiros prontos para o consumo, uma vez que não há relatos na literatura científica nacional sobre a eficácia desses aditivos em queijos.

- A partir da divulgação dos resultados encontrados, espera-se contribuir com as ações da Vigilância Sanitária e Epidemiológica de Alimentos do município de Salvador e com as indústrias de alimentos do Brasil na implantação e/ou intensificação de programas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e de sistemas como Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC, que permitem atuar nas diversas etapas da produção e distribuição de alimentos.

- O uso de tecnologias alternativas para o controle de patógenos em alimentos, em especial de *L. monocytogenes*, deve ser mais bem estudada para se conseguir a erradicação da bactéria no alimento; além disso, o uso de substâncias GRAS, como bacteriófagos e sais de ácidos orgânicos, deve ser incentivado junto às indústrias de alimentos.