

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**SOBREVIVÊNCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM SALAME TIPO ITALIANO
DE BAIXA ACIDEZ, PRODUZIDO SOB CONDIÇÕES BRASILEIRAS DE
FABRICAÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para
a obtenção do grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Ernani S. Sant'Anna.

ROBERTO DEGENHARDT
(BIÓLOGO)

FLORIANÓPOLIS - SC
Novembro - 2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Ernani S. Sant'Anna, pela amizade e o apoio ao longo deste período de estudo;

As Empresas Perdigão S/A pelo financiamento do projeto, e em especial ao Sr. Joaquim Goulart Nunes, Gerente de Garantia da Qualidade, pela confiança e apoio;

Ao Msc. Paulo R. Franchin pela amizade, estímulo e pelas dicas;

Ao Dr. João Degenhardt e Eduardo Degenhardt pela ajuda no desenvolvimento dos testes e pelas críticas, sem as quais o trabalho não poderia ser possível;

Aos Colegas do Curso pela amizade construída, em especial à Cony Gauche, pela ajuda nas revisões e por seu espírito científico e de colaboração, que é um grande exemplo;

A minha Família, em especial a minha mãe, sempre presentes, mesmo quando eu estava ausente;

Aos amigos do Laboratório e Garantia da Qualidade da Perdigão, que sem sua colaboração no trabalho na empresa, não permitiria que eu pudesse estar concluído esta etapa de minha formação;

Aos amigos, muito queridos, Miguel, Simone e Reginaldo, por sua amizade incondicional.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1 - Revisão Bibliográfica.....	2
1 Padrão de Identidade de Salames.....	2
2 Processo de Fabricação de Salames.....	3
2.1 Formulação.....	3
2.2 Preparação da Massa.....	8
2.3 Embutimento.....	8
2.4 Cura, Fermentação e Maturação.....	9
3 Microbiologia da Carne Curada e Fermentada.....	16
3.1 Importância das leveduras e mofos em produtos cárneos fermentados.....	16
3.2 Microrganismos deteriorantes.....	17
3.3 Microrganismos patogênicos.....	18
3.4 Listeria.....	19
3.5 Presença de Listeria em plantas de processamento de alimentos cárneos.....	22
3.6 Presença de Listeria em embutidos crus fermentados.....	23
4 Medidas de controle de Listeria monocytogenes em produtos cárneos curados e fermentados.....	25
4.1 Diminuição do pH.....	25
4.2 Atividade Água.....	27
4.3 Atuação do Cloreto de Sódio.....	28
4.4 Atuação de Nitratos e Nitritos.....	29
4.5 Interferência Microbiana.....	29
4.6 Lactato de Sódio.....	32
5 Referências Bibliográficas.....	33
CAPÍTULO 2 - Artigo: SOBREVIVÊNCIA DE LISTERIA MONOCYTOGENES EM SALAME TIPO ITALIANO DE BAIXA ACIDEZ, PRODUZIDO SOB CONDIÇÕES BRASILEIRAS DE FABRICAÇÃO.....	45
ABSTRACT:.....	47
RESUMO:.....	48
INTRODUÇÃO.....	49
MATERIAL E MÉTODOS.....	49
Preparação dos Salames.....	50
Parâmetros tecnológicos.....	51
Análises microbiológicas.....	51
Análises físico-químicas.....	52
Análise estatística.....	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
pH e Atividade Água.....	53
Contagem de Bactérias Lácticas.....	53
Sobrevivência de <i>L. monocytogenes</i> em amostras controle.....	54
Sobrevivência de <i>L. monocytogenes</i> em amostras artificialmente contaminadas.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
AGRADECIMENTOS.....	62
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Formação de cor em produtos cárneos (segundo Terra, et al., 2004)	5
Figura 2 – Esquema de diminuição do pH via fermentação química.....	11
Figura 3 – Esquema genérico da fabricação de salames	12
Figura 4 – Esquema genérico do processo de embutimento, cura e maturação de salames.....	12

CAPÍTULO 2

Figura 1: Sobrevivência de <i>L. monocytogenes</i> em salames tipo Italiano controle, ao longo da fermentação e maturação. A1 = FP: Tratamento A1 – Formulação padrão; B1 = FP + Lp: Tratamento B1 – Formulação padrão inoculada com <i>L. plantarum</i> ; C1 = FP + Lact. Na: Tratamento C1 – Formulação padrão com 2% de Lactato de sódio.....	55
Figura 2: Sobrevivência de <i>L. monocytogenes</i> em salames tipo Italiano artificialmente contaminados, ao longo da fermentação e maturação. A2 = FP + Lm: Tratamento A2 – Formulação padrão inoculada com <i>L. monocytogenes</i> ; B2 = FP + Lp + Lm: Tratamento B2: Formulação padrão inoculada com <i>L. plantarum</i> e <i>L. monocytogenes</i> ; C2 = FP + Lact. Na + Lm: Tratamento C2 – Formulação padrão com 2 % de Lactato de sódio inoculada com <i>L. monocytogenes</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Codificação das formulações de salame Tipo Italiano preparadas para verificar a sobrevivência de <i>Listeria monocytogenes</i>	50
Tabela 2: Parâmetros tecnológicos de cura e maturação.....	51
Tabela 3: Resultados de contagens de bactérias ácido-láticas (LAB), pH and atividade água (A_w) durante o período de cura e maturação de salames.	54

RESUMO

O baixo risco dos salames em provocarem a listeriose é atribuído aos obstáculos criados durante processo de fabricação e presentes no produto final. O pH e atividade água baixos, alta concentração de sal e a presença de bactérias ácido-lácticas e seus metabólitos secundários compõe barreiras que impedem o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*. Neste trabalho avaliou-se o comportamento das curvas de sobrevivência deste patógeno durante o processo de fabricação de salames tipo Italiano pouco ácidos (pH final de 5,2) em três formulações: inoculada com *Lactobacillus plantarum*, com adição de 2% lactato de sódio e uma formulação sem agentes inibidores intencionais. Cada formulação foi contaminada artificialmente com *L. monocytogenes* e paralelamente acompanhada por uma testemunha de igual composição. O tamanho das populações de *L. monocytogenes* foi avaliado semanalmente através de contagem pela técnica de tubos múltiplos (NMP), durante o período de fabricação de quatro semanas. Os salames naturalmente contaminados apresentaram discreto aumento da população de *L. monocytogenes* no início do processo, seguidas por redução até o final da maturação e os salames artificialmente contaminados tiveram redução considerável da contagem de *L. monocytogenes*, principalmente na formulação com adição de *L. plantarum*, seguido pela formulação com lactato de sódio e por último a formulação padrão, entretanto não se verificou diferença significativa entre os tratamentos.

ABSTRACT

The low risk of salamis in provoking listeriosis is attributed to the obstacles created during production process and presents in the final product. The pH and low water activity, high concentration of salt and the presence of lactic acid bacteria and their secondary metabolites compose barriers that prevent the development of *Listeria monocytogenes*. In this work the behavior of the survival curves of this pathogen was evaluated during the production process in salamis Italian type slightly acid (final pH of 5,2) in three formulations: inoculated *Lactobacillus plantarum*, with addition of 2% sodium lactate and a formulation without intentional inhibitors agents. Each formulation was contaminated artificially with *L. monocytogenes* and parallel accompanied by a witness sample of equal composition. The size of the populations of *L. monocytogenes* was weekly evaluated through counting by the technique of multiple tubes (NMP), during the period of production of four weeks. The naturally contaminated sausage had presented discreet increase of the population of *L. monocytogenes* in the beginning of the process, followed by reduction until the end of the maturation and the salamis artificially contaminated had considerable reduction of the counting of *L. monocytogenes*, mainly in the formulation with addition of *L. plantarum*, followed by the formulation with sodium lactate and last the standard formulation, however significant difference was not verified among the treatments.

INTRODUÇÃO

O processo de fabricação de embutidos fermentados e dessecados foi criado em torno do Mediterrâneo a séculos, e desde então vem sendo aprimorado. A carne moída ou picada temperada com sal e especiarias, seguida pela secagem em rolos, tornou o salame uma forma efetiva de preservar a carne (Bacus, 1984). Séculos de desenvolvimento das técnicas de salga, secagem e acidificação através da fermentação natural da carne crua resultou em uma variedade de apreciados produtos trazidos pelos imigrantes para o novo mundo (Baumgartner, et al., 1980). A variabilidade destes produtos decorre das tecnologias aplicadas na sua preparação e nas proporções de carne, suína e bovina, e de gordura suína (Astiasaram, et al., 1990).

Durante o processo de produção, elaboração, transporte, armazenamento e distribuição, qualquer alimento está sujeito à contaminação por substâncias tóxicas ou por bactérias patogênicas, vírus e parasitas (Catão, 2001).

A carne e os produtos cárneos são alimentos ricos em nutrientes constituindo-se em excelentes meios de cultura para uma diversidade de microrganismos. A capacidade de sobrevivência ou de multiplicação destes microrganismos depende de uma série de fatores, relacionados com o próprio alimento - fatores intrínsecos - ou relacionados com as características do ambiente em que estes alimentos se encontram - fatores extrínsecos (Germer, et al., 1995, Franco, et al., 1996; Jay, 2005).

Embora ao final do processo de fabricação de salames, estes produtos apresentem condições restritas de sobrevivência para a maioria dos patógenos, a sobrevivência da *Listeria monocytogenes* ainda é possível (Borges, et al., 1999). Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* no processo de fabricação de salames tipo italiano de baixa acidez (5,2 – 5,4) produzido sob as condições brasileiras de fabricação e na presença de *Lactobacillus plantarum* (HOLBAC – Danisco) e de Lactato de Sódio intencionalmente adicionados.

CAPÍTULO 1 - Revisão Bibliográfica

1 Padrão de Identidade de Salames

Tradicionalmente as tecnologias de produção de embutidos cárneos fermentados têm sido distintas em duas grandes escolas. A escola Italiana, onde predominam os salames produzidos principalmente na Itália, Espanha e França, e a escola Germânica, cujos principais produtores são a Alemanha e países escandinavos. Cada escola se caracteriza pelo tipo de produto elaborado. As variedades germânicas são preparadas com carne suína e bovina, levemente temperadas, mas com sabor mais picante devido à acidez maior. São embutidos semi-secos defumados e freqüentemente cozidos. As variedades italianas, por sua vez são preparadas predominantemente com carne suína bem condimentada, secas e não defumadas (Bacus 1984; Ordóñez, et al., 1999; Terra, et al., 2004).

A Instrução Normativa N° 22, de 31/07/2000 que fixa os padrões de identidade para embutidos curados e fermentados produzidos no Brasil, determina que os salames em geral devam ser produzidos a partir de carne predominantemente suína (mínimo de 60%, exceto o salame tipo hamburguês, no qual o teor mínimo exigido de carne suína é de 50%) e toucinho, sendo, portanto, permitido o acréscimo de carne bovina. Ao final da cura e maturação devem apresentar umidade máxima de 40%, gordura máxima de 35% e proteína mínima de 20%. A atividade de água (A_w) máxima deve ser de 0,92.

Os salames brasileiros se distinguem dos produzidos na Europa pela acidez mais branda, com pH entre 5,2 e 5,4 (Terra, et al., 2004) e pelas características da carne, atribuídas ao manejo da criação, raças dos animais e características de abate. Além destas características também se ressalta o desenvolvimento de tecnologia própria pelos fabricantes brasileiros, como a defumação do salame Italiano, que na Europa, tradicionalmente não recebe este tipo de tratamento.

2 Processo de Fabricação de Salames

O processo de fabricação de embutidos fermentados consiste em um complexo fenômeno biológico provocado por microrganismos desejáveis que atuam sinergicamente (Samelis et al. 1998).

2.1 Formulação

O início da produção de salames ocorre com a seleção e preparo dos ingredientes. O emprego de matérias primas e ingredientes de boa procedência são imprescindíveis à qualidade do produto final.

2.1.1 Carne

No processo de fabricação de salames a carne é cortada até a obtenção da granulometria desejada e que caracteriza o tipo de embutido. As fibras musculares são trituradas e as proteínas miofibrilares, que compreendem aproximadamente 80% dos constituintes celulares, são expostas à ação do NaCl que atua na solubilização dessas proteínas, produzindo mudanças estruturais importantes. As proteínas produzem agregados filamentosos que interagem e contribuem para estabilidade do gel, fator necessário à textura e estrutura desses produtos (Oliveira e Mendonça, 2004).

A qualidade microbiológica da carne é de suma importância à obtenção do produto final.

2.1.2 Gordura

A gordura empregada na elaboração de embutidos fermentados é predominantemente a gordura subcutânea de suínos (toucinho). O toucinho é picado em fragmentos com granulometria que caracteriza o tipo de embutido produzido. A qualidade da gordura utilizada é fundamental para a qualidade final do produto, pois contribui significativamente para o estabelecimento da estrutura e características organolépticas do salame. A qualidade microbiológica final dos salames é fortemente influenciada pelas condições microbiológicas do toucinho, já que este não sofre ação significativa da fermentação.

2.1.3 Sal

O cloreto de sódio é um dos principais ingredientes dos sais de cura (Ordóñez, 2005). Em concentração adequada, o sal inibe o crescimento microbiano devido ao aumento da pressão osmótica no alimento, reduzindo conseqüentemente a atividade água. O sal em baixas concentrações faz a carne inchar e reter água, mas em altas concentrações, as proteínas são precipitadas e retém menos água (Pardi, et al. 2001). O sal desempenha um papel importante na textura e aroma dos produtos cárneos re-estruturados, possivelmente isto é devido ao fato de que o sal facilita a solubilização das proteínas miofibrilares e atua como um pró-oxidante nos sistemas cárneos, ativando componentes que aceleram a auto-oxidação dos lipídeos e interagindo com os tecidos da carne produzindo compostos aromáticos desejáveis (Ordóñez, 2005).

2.1.4 Sais de Cura

O uso de nitratos e nitritos de sódio ou potássio tem a finalidade de desenvolver a cor característica da carne curada, agir como bacteriostático em meio ácido, contribuir para o desenvolvimento do aroma característico da carne curada e retardar o desenvolvimento da rancificação (Ordóñez, 2005). Nas fórmulas de cura, podem ser adicionados nitrito de sódio ou nitrito de potássio, embora raramente este último seja utilizado (Pardi, et al. 2001). O nitrato atua como fonte de nitrito, permitindo que a carne mantenha um nível de nitrito eficaz para sua conservação. O nitrato é reduzido a nitrito mediante um processo bacteriano, mas para que a quantidade reduzida seja significativa, é necessário um número de bactérias razoavelmente alto, que pode ser prejudicial aos produtos cárneos curados e dificilmente sabe-se da quantidade de nitrito que pode formar-se. A tolerância ao nitrito varia amplamente entre diferentes grupos de bactérias, existindo diversas explicações das propriedades bacteriostáticas do nitrito (Ordóñez, 2005).

Nos sistemas biológicos o íon nitrito ou ácido nitroso pode interagir em muitas reações químicas. A reação de Van Slyke ($\text{RCHNH}_2\text{COOH} + \text{HNO}_2 \rightarrow \text{RCHOCOOH} + \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$) constitui um exemplo clássico da liberação de nitrogênio através da reação do ácido nitroso com os alfa-aminoácidos para formar os alfa-hidroácidos correspondentes. Como conseqüência desta reação, o nitrito adicionado pode desaparecer durante a cura de carnes. A presença de ácidos nas carnes curadas faz, portanto, o nitrito desaparecer mais

rapidamente, via reação de Van Slyke (Lawrie, 2005).

A cor vermelha atraente das carnes curadas é aquela da nitrosomioglobina. O nitrito reage inicialmente com a oximioglobina, formando a metamioglobina, e com o ferrocitocromo-c formando nitrosoferrocitocromo-c. O grupo nitroso é transferido do nitrosoferrocitocromo-c para a metamioglobina pela ação da NADH-citocromo-c redutase, formando a nitrosometamioglobina. A nitrosometamioglobina é reduzida à nitrosomioglobina pelos sistemas enzimáticos da mitocôndria muscular. A nitrosometamioglobina também se auto-reduz a nitrosomioglobina sob condições anaeróbicas, mas, aerobicamente, ela se rompe formando metamioglobina (Lawrie, 2005).

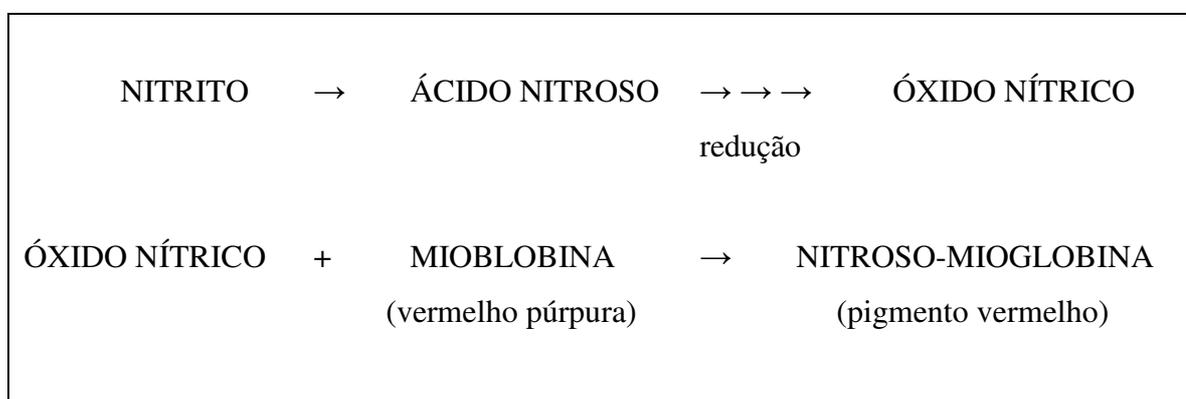


Figura 1 – Formação de cor em produtos cárneos (segundo Terra, et al., 2004)

2.1.5 Açúcares

O açúcar também é um aditivo do processo de cura, proporcionando aroma à carne curada e permitindo o desenvolvimento de algumas bactérias desejáveis, produtoras do aroma. O açúcar evita o salgamento excessivo, moderando o sabor, ao mesmo tempo em que ajuda na diminuição da umidade. Há indícios que favorece a formação da cor durante a defumação, sendo a adição de açúcar à formulação dos embutidos fermentados uma prática rotineira. A presença de açúcar cria condições redutoras durante o processo de cura, o que previne o desenvolvimento de aromas de oxidação. O ambiente redutor formado influi na cor da carne curada porque estabiliza o Fe²⁺ (Ordóñez, et al., 2005).

2.1.6 Culturas Microbianas

Os cultivos iniciadores vêm sendo utilizados em larga escala pela indústria na

preparação de produtos cárneos fermentados (Bacus, 1984).

Segundo Lücke (2000) a adição de microrganismos desejáveis nas carnes possui quatro diferentes propósitos:

- a) Promover a segurança do alimento pela inativação de microrganismos patogênicos;
- b) Promover a estabilidade do produto, aumentando sua vida de prateleira pela inibição de alterações indesejáveis por microrganismos indesejáveis ou reações abióticas;
- c) Diversificação de produtos por alterações na matéria prima crua obtendo novas propriedades sensoriais;
- d) Promover benefícios à saúde através dos efeitos positivos sobre a microbiota intestinal.

No processo de fabricação de salames pelo menos as três primeiras premissas são alcançadas (Lücke, 2000).

A CHR Hansen (1987) destaca que as principais vantagens das culturas iniciadoras são:

- a) Redução do uso de sais de cura: a ação de enzimas nitrato redutase e a correção do pH, provocado pela ação das culturas torna possível o uso mais racional dos sais de cura, evitando-se assim o emprego deste aditivo em excesso;
- b) Redução do uso de antioxidantes: as culturas microbianas possuem atividades catalásicas na presença de mioglobina (catalase +), reduzindo o índice de peróxido de hidrogênio livre no produto evitando desta forma este tipo de oxidação, agindo dessa forma como um antioxidante complementar ou auxiliar. O *Micrococcus violagabriella*, além da enzima nitrato redutase, contém a enzima catalase evitando assim a concentração de água oxigenada no produto. O peróxido de hidrogênio é um pró-oxidante, que além de provocar a oxidação da nitroso-mioglobina (vermelho-rosado) em meta-mioglobina (marrom esverdeado), acelera a rancificação das gorduras. O *Lactobacillus plantarum* e o *Pediococcus pentosaceus*, quando utilizados em sistemas cárneos são incapazes de acumular o peróxido de hidrogênio e possuem atividade catalásica quando em presença de mioglobina.
- c) Produtos com sabor e aromas naturais: a produção de ácido láctico e compostos voláteis, liberados pela flora inoculada, aliado a enzimas proteolíticas e lipolíticas, proporcionam ao produto final consistência, aroma e sabor mais natural. Os carboidratos estão naturalmente presentes na matéria-prima (carnes) na forma de glicogênio, mas também podem ser adicionados na formulação, para se obter uma maior acidificação. Pode-se adicionar a

glicose, lactose, maltose, etc. A diminuição do pH (acidificação) é desejável para obter coloração, aromas e textura consistente, como também inibir a flora de microrganismos contaminantes naturais da matéria-prima. O *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*, são bactérias homofermentativas, isto é, produzem apenas ácido lático, ao contrário de bactérias heterofermentativas que produzem a partir do açúcar, outros subprodutos como álcoois, cetonas, ácido acético, etc.

d) Produtos com maior vida de prateleira: o conjunto destas reações enzimáticas, aliado a um controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes, que apresentarão um desenvolvimento reduzido pela ação da flora microbiana inoculada, conferindo ao produto final uma maior vida de prateleira.

e) Inibição da microbiota indesejável: são contaminantes indesejáveis, bactérias patogênicas, putrefativas, bactérias que produzem compostos químicos, gases e subprodutos indesejáveis e alguns fungos que podem conferir sabores estranhos ao produto. A inibição de contaminantes indesejáveis acontece devido aos seguintes fatores: predomínio da cultura inoculada; acidificação do produto; produção de lactoflavina e substâncias que inibem o crescimento de contaminantes. A contagem dos microrganismos adicionados à formulação é superior a flora natural da carne, conseqüentemente estes predominam na competição biológica pelo substrato. A produção de ácido lático, substâncias inibidoras, abaixamento do pH dá melhores condições de sobrevivência para as bactérias desejáveis e dificultará o crescimento das patogênicas. A maioria das bactérias patogênicas necessita de um pH elevado para se desenvolver, em pH mais baixo o desenvolvimento é mais lento deixando de produzir toxinas.

O uso das culturas starter como recurso biotecnológico é baseado na adição de microrganismos vivos à carne e, portanto é necessário que certas condições sejam fornecidas para que estes possam se desenvolver e predominem sobre a flora natural presente na matéria-prima. Estas condições devem permitir que os microrganismos produzam compostos ou provoquem reações que confirmam ao produto final uma qualidade superior. O conhecimento e o controle de todos os elementos que regem estes parâmetros permitem direcionar o desenvolvimento dos microrganismos para obter vantagens no processamento e produtos em melhores condições de qualidade e conservação (Bacus, 1984).

2.2 Preparação da Massa

A preparação da massa consiste na moagem da carne e do toucinho até a granulometria desejada e mistura dos demais componentes da formulação. Nesta etapa ocorre a adição do sal que irá atuar na extração das proteínas e formação da liga da massa.

Esta etapa pode ser conduzida de duas formas:

- a) Em *cutter* onde a moagem e mistura dos ingredientes ocorre simultaneamente ou consecutivamente,
- b) Ou então as matérias primas cárneas são previamente moídas na granulometria desejável e depois os componentes são homogeneizados em misturadeira. Este modelo de preparação de massa apresenta o inconveniente de provocar o esmagamento dos grânulos de carne e gordura comprometendo a estrutura final do produto.

2.3 Embutimento

O embutimento consiste na introdução da massa nos envoltórios que irão conferir a forma do salame. Nesta etapa é importante observar a pressão com que a massa é acondicionada na tripa evitando a introdução de bolhas de ar e que a peça tenha consistência firme.

O calibre da tripa utilizada determina o tempo de duração do processo, pois está diretamente correlacionado com a secagem do produto.

Outra característica a ser observada é a permeabilidade da tripa. Esta característica está envolvida no processo de secagem e também na penetração de oxigênio no interior da peça.

2.3.1 Envoltórios Naturais

Os envoltórios naturais utilizados são intestinos de suínos, bovinos ou caprinos. Seu uso tem sido abolido devido a características como a despadronização do calibre, permeabilidade alta e questões higiênicas.

2.3.2 Envoltórios Artificiais

Os envoltórios artificiais são confeccionados a partir de celulose ou colágeno e

têm como vantagens a padronização do calibre, permeabilidade determinada e não apresentar problemas higiênicos na sua obtenção.

2.4 Cura, Fermentação e Maturação

2.4.1 Cura

O termo cura de carnes se refere à conservação da mesma por adição de sal, compostos fixadores de cor (nitratos e/ou nitritos), açúcar e condimentos, onde também é obtida a melhora das propriedades sensoriais (Pardi, et al. 2001).

O reconhecimento do valor do nitrato de sódio na produção de cor atrativa pode muito bem ter sido devido às impurezas acidentais do cloreto de sódio empregado. No final do século XIX, reconheceu-se que as salmouras de carnes possuíam nitritos e que este era o agente fixador da cor e que o mesmo era produzido pela redução do nitrato. A eficácia do processo e das muitas variantes que foram desenvolvidas (incluindo o uso do açúcar) tem origem, basicamente, na manutenção do crescimento microbiano causado pelo aumento da pressão osmótica em tais produtos. No transcorrer dos anos, as carnes curadas se tornaram valorizadas por sua qualidade organoléptica em si e houve, assim, a tendência para diminuir a concentração dos ingredientes de cura. Isso fez com que esses produtos levemente curados ou semi-preservados se tornassem mais sujeitos à contaminação, fazendo-se necessário o uso de algum grau de refrigeração. (Lawrie, 2005).

2.4.2 Fermentação

Os alimentos fermentados são preservados em primeira mão pela conversão dos açúcares em ácidos orgânicos, diminuição do pH e remoção de carboidratos como fonte de nutriente, estendendo a vida de prateleira e a segurança do produto final (Moreno, 1999).

Os principais objetivos da fermentação, em produtos cárneos, são a formação de sabor característico, desenvolvimento de um produto firme com características de fatiabilidade, além da inibição de bactérias deteriorantes e patogênicas. Estes objetivos podem ser alcançados por meio de uma interação microbiológica complexa, por reações químicas e por fatores físicos (Hammes et al., 1990).

A fermentação é uma importante fase do processo de elaboração de salames devido

às transformações físicas, químicas e microbiológicas que ocorrem. Essas mudanças são influenciadas pelas características da carne crua e as condições de processamento, culminando nas características organolépticas do produto final (flavor, cor e textura). As principais transformações que ocorrem são a mudança na microbiota inicial, diminuição do pH, redução de nitratos a nitritos e a óxido nítrico e a formação de nitrosomioglobina, solubilização e gelificação de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, fenômenos proteolíticos, lipolíticos e oxidativos (Lizaso, et al., 1999).

2.4.2.1 Fermentação biológica

O uso de culturas em produtos cárneos visa principalmente melhorar a qualidade final do produto, complementando ou substituindo em parte o uso de aditivos e conservantes químicos (CHR. Hansen, 1987).

A fermentação láctica é uma das mais importantes fermentações da indústria alimentícia, que além de atuar na conservação dos alimentos, também confere características sensoriais agradáveis. Todos os microrganismos envolvidos neste tipo de fermentação são bactérias, que produzem predominantemente ácido láctico a partir de açúcares. Os açúcares utilizados são principalmente a lactose, glicose e sacarose. As bactérias envolvidas neste processo são geralmente dos gêneros *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, as quais são homofermentativas, ou seja, produzem principalmente ácido láctico (Prado, 1996).

2.4.2.2 Fermentação química

A glucona-delta-lactona (GDL) é uma substância neutra e segundo a Resolução nº 386, de 05 de agosto de 1999 é classificada como acidulante, fermento químico e regulador de acidez. Quando é adicionada à mistura de carnes reage com a água presente e é transformada em ácido glucônico. Como consequência o pH da carne diminui. O uso de GDL permite a padronização do processo de acidificação e o início da mesma logo após a sua adição na massa do produto.

Altas concentrações de GDL podem afetar negativamente o flavor e a consistência dos embutidos. Durante o armazenamento o ácido glucônico pode ser quebrado resultando em um sabor amargo ou metálico e consistência esfarelada. A adição de culturas de estafilococos pode minimizar e aumentar o tempo para a ocorrência dessas características

indesejáveis (CHR – Hansen, 2001).

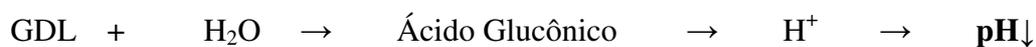


Figura 2 – Esquema de diminuição do pH via fermentação química.

2.4.3 Maturação

Segundo Baumgartner et al. (1980) a maturação consiste em todas as mudanças químicas, físicas, microbiológicas e enzimáticas que ocorrem nos salames sob condições de temperatura e umidade controladas.

A principal alteração que ocorre seguida à etapa de fermentação é a secagem do embutido. A atividade de água é reduzida (<0,88), contribuindo desta forma para o desenvolvimento da textura do embutido e tornando-se um fator primordial de conservação e estabilidade. O processo de secagem é afetado pela presença de NaCl devido ao seu efeito na solubilidade e capacidade de ligar proteínas. Além da secagem ocorrem processos de proteólise e lipólise, que permitem o desenvolvimento do aroma típico e a estabilização da cor, finalizando a preparação para o armazenamento do produto (Galli, 1993).

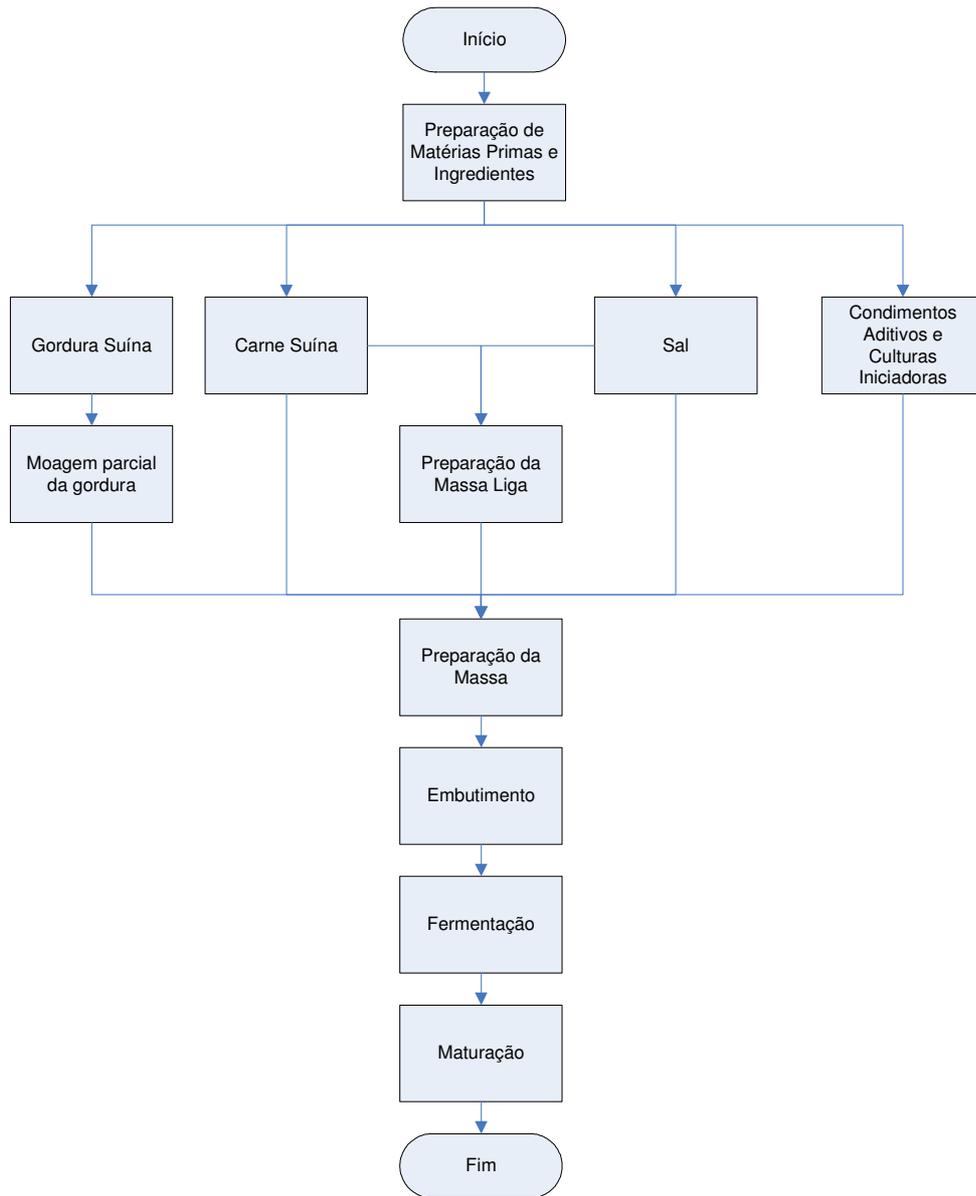


Figura 3 – Esquema genérico da fabricação de salames

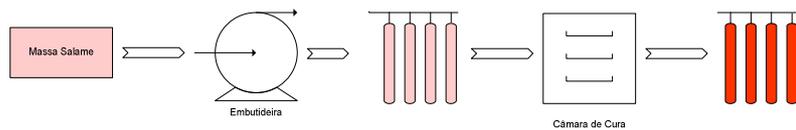


Figura 4 – Esquema genérico do processo de embutimento, cura e maturação de salames.

2.4.4 Parâmetros de Processo

O uso das culturas starter como recurso biotecnológico exige o fornecimento de certas condições para que estas possam se desenvolver e predominar sobre a flora natural presente na matéria-prima. Estas condições devem permitir que os microrganismos produzam compostos ou provoquem reações que confirmem ao produto final uma qualidade superior. O conhecimento e controle de todos os elementos que regem estes parâmetros permitem direcionar o desenvolvimento dos microrganismos para obter vantagens no processamento e produtos em melhores condições de qualidade e conservação.

2.4.4.1 Tempo e Temperatura

O tempo e a temperatura representam um binômio importante no controle do desempenho de culturas microbianas. A temperatura de fermentação pode variar de 25°C até 43°C. Estas condições selecionam bactérias lácticas que chegam a contagens de 10⁸ UFC/g e provocam a acidificação do produto. Durante a fase inicial da fermentação também ocorre o crescimento de micrococcos (estafilococos coagulase negativa) responsáveis pela redução do nitrato a nitrito, contribuindo ainda para o desenvolvimento do sabor e aroma (ICMSF, 1998).

As linhagens de *Lactobacillus plantarum* se desenvolvem dentro da faixa de 15°C até 40°C apresentando, porém atividade em temperaturas em torno de 5°C. O *Pediococcus pentosaceus* desenvolve-se normalmente na faixa de 15°C até 48°C apresentando atividade até 55°C, enquanto o *Staphylococcus carnosus* desenvolve-se normalmente na faixa de 10°C até 45°C, apresentando atividade em temperatura de refrigeração (4 a 8°C) (Bacus, 1984).

Porém, a temperatura ótima para o desenvolvimento destes microrganismos, onde apresentam maior crescimento, está na faixa de 30°C e 35°C. Desta forma, em função da temperatura, deve-se trabalhar com tempos adequados para obter-se o desenvolvimento microbiano nos níveis desejados (Bacus, 1984).

Nos produtos fermentados, empregam-se inicialmente temperaturas mais elevadas (24°C a 27°C), a fim de se obter uma rápida atividade das culturas inoculadas nas primeiras 24 ou 36 horas (UR = 90 a 95% e velocidade do ar = 0,5 a 0,8 m/s). Nestas condições ocorre uma rápida acidificação no produto, onde seu pH, atinge 5,1 a 5,3. Este procedimento permite o controle sobre o desenvolvimento da microbiota indesejável e

permite a secagem e formação de cor homogênea durante as etapas de cura e maturação do produto (Bacus, 1984).

2.4.4.2 Umidade Relativa

A secagem do salame é uma etapa que deve ser muito bem controlada. Se as condições de secagem forem muito drásticas, ocorrerá formação de uma crosta seca na superfície que contribuirá para a manutenção da umidade no interior do produto, o que pode causar problemas de conservação devido à alta atividade de água na porção central do salame (Galli, 1993).

A umidade relativa do ar na câmara climática interfere na desidratação do produto, já que uma relação de equilíbrio das massas de água é estabelecida entre o ar e o produto (Silva, 2000).

Os parâmetros de umidade variam consideravelmente entre as várias linhas de tecnologia de produção. Baumgartner et al. (1980) utilizaram valores de 90% de umidade na primeira semana, seguida por 88% na segunda e 80% nas duas últimas semanas do processo de fabricação.

Astiasaram et al. (1990) citam parâmetros de umidade de 95% nos três primeiros dias de cura seguidos por 4 semanas a uma umidade relativa de 78% na produção de Chorizo, Saucisson e Salame.

Samelis et al. (1998) empregaram uma redução gradativa umidade relativa de 94% a 90% nos primeiros 7 dias de fermentação e 80% de umidade nas três últimas semanas do processo.

Encinas et al. (1999) citam a produção de Chorizo sob condições de umidade de 70 a 80%.

Työppönen et al. (2003) prepararam salames estabelecendo como umidade inicial de 93% no primeiro dia, reduzindo para 84% no segundo dia diminuindo gradualmente 2% a umidade até o quarto dia de fermentação. Após a defumação a secagem foi fixada em 75%.

Terra et al. (2004) empregaram uma redução crescente de umidade de 95% a 75% nos primeiros 7 dias de fermentação e a secagem até o 30º dia a 95% de umidade.

Thévenot et al. (2005) estabeleceram como parâmetros de umidade em seus experimentos uma redução gradual nos primeiros 5 dias de 96-94% a 88-93% e no período

de secagem (30 dias) uma faixa de umidade de 80 a 82%.

2.4.4.3 Velocidade do Ar

O fluxo da corrente de ar influencia diretamente na secagem do produto e é um dos principais parâmetros de processo que são controlados na fabricação de salames. A velocidade de secagem depende das propriedades do ar (temperatura, umidade e velocidade).

Segundo Silva (2000), a velocidade da secagem é regida pela rapidez com que o ar transfere calor à água da película superficial do alimento e a eliminação do vapor de água produzido. Inicialmente a água migra para a superfície na mesma velocidade de sua evaporação. No decorrer do processo de secagem alcança-se um ponto, no qual a água não consegue difundir-se para a superfície na mesma velocidade que é evaporada, deste ponto em diante a secagem é controlada pela velocidade de difusão da umidade. À medida que o teor de umidade diminui, reduz-se também a velocidade de difusão e conseqüentemente a velocidade de secagem.

No processo de fabricação de salame italiano Terra et al., (2004) utilizaram inicialmente como parâmetro de velocidade do ar 0,5 m/s do primeiro ao sexto dia, e uma velocidade do ar de 0,2 m/s no restante do período.

3 Microbiologia da Carne Curada e Fermentada

A microbiota da carne curada é totalmente diferente da carne fresca. Os sais de cura e as etapas do processo de fabricação alteram o microambiente da carne favorecendo o crescimento de bactérias Gram-positivas em detrimento dos inicialmente presentes, em geral aeróbios Gram-negativos. Este fenômeno é conhecido como inversão microbiana, que pode inclusive contribuir para o aumento da vida de prateleira do produto final (Bacus, 1984; Forsythe, 2002).

Os microrganismos presentes na carne curada incluem membros dos gêneros *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Microbacterium*, além de leveduras e bolores (Franco et al., 1996).

Muitos patógenos de alimentos não se desenvolvem em carnes curadas devido ao sal e ao nitrito serem eficientes inibidores (Forsythe, 2002). Em contrapartida, o ambiente seletivo favorece o rápido desenvolvimento de bactérias ácido-láticas, comparado aos potenciais competidores. Este crescimento geralmente é acompanhado pela produção de ácido o qual reduz o pH, inibindo consequentemente patógenos. Contudo intoxicações alimentares provocadas por cepas de *Staphylococcus* podem ocorrer pelo desenvolvimento da bactéria antes da redução do pH. Produtos curados e maturados têm sido associados a muitos casos de intoxicação alimentar e nestes casos isto é resultado de contaminação e maus cuidados anteriores à produção (ICMSF, 1998).

3.1 Importância das leveduras e mofos em produtos cárneos fermentados

Segundo Vieira et al., (2005), as leveduras estão presentes em pequeno número na microbiota da carne e, sua capacidade de crescimento a baixas temperaturas, altas concentrações de sal e baixa tensão de oxigênio, as habilita a multiplicar em carnes e produtos refrigerados, curados e embalados a vácuo, sendo consideradas deteriorantes importantes neste tipo de produtos. Portanto, nos produtos cárneos curados e/ou fermentados, os valores baixos de atividade água e pH são os principais fatores de seleção da microbiota leveduriforme. A levedura *Debaryomyces hansenii*, é caracterizada pela sua tolerância ao sal e ao nitrato, e elevada demanda de oxigênio, sendo a principal levedura utilizada como cultivo iniciador em produtos cárneos.

Vieira et al., (2005) citam diversos trabalhos que tratam da participação de leveduras na maturação de produtos cárneos secos, contribuindo para as características organolépticas destes produtos. As leveduras metabolizam ácidos orgânicos como o ácido láctico, acético e cítrico e produção de amônia decorrente da proteólise, em função disso, ocorre a elevação do pH. Isto pode ocasionar a redução da concentração das substâncias protetoras do alimento, favorecendo o crescimento de microrganismos indesejáveis. Estudos realizados com a utilização de diferentes leveduras como starter, principalmente *Debaryomyces hansenii*, mostraram a contribuição destas no desenvolvimento da cor e flavor, pela remoção do oxigênio, habilidade em degradar peróxidos, atividade lipolítica e em menor grau, atividade proteolítica. Quando presentes na superfície, as leveduras protegem os salames do efeito adverso da luz.

Os mofos superficiais desenvolvem-se ao longo do processo de maturação dos salames e tanto podem ocorrer naturalmente decorrentes da contaminação do ar como podem ser inoculados na superfície do produto. Na primeira situação podem se desenvolver bolores indesejáveis que comprometem a aparência final do produto e exigem a lavagem das peças no final da fabricação. A inoculação de bolores na superfície do produto permite a utilização de espécies desejáveis que promovem proteção quanto a penetração do ar e a incidência de luz.

3.2 Microrganismos deteriorantes

Devido sua composição química, a carne é um excelente meio de cultura. A quantidade e os tipos de microrganismos que se desenvolverão na carne dependerão das condições de produção. Os tipos de deterioração mais comuns são classificados de acordo com a atmosfera que envolve os produtos e a temperatura de conservação (Franco et al, 1996).

As alterações bacterianas em embutidos fermentados podem ocorrer durante sua fabricação, antes que a atividade água e o pH sejam suficientemente baixos para impedir o desenvolvimento microbiano. O desenvolvimento de mofos em produtos prontos origina um aspecto desagradável e algumas vezes com aromas estranhos. Evita-se este desenvolvimento embalando-se os produtos em atmosferas modificadas ou a vácuo (ICMSF, 1998)

Segundo Franco, et al., (1996), Pardi, et al., (2001) e Forsythe (2002) os tipos de deterioração em carnes curadas são:

- a) Deterioração da superfície: externamente a carne ou embutido apresenta aspecto limoso, resultante do crescimento de grandes quantidades de microrganismos na superfície e contendo misturas das bactérias e leveduras;
- b) Acidificação: a partir do extensivo desenvolvimento de microrganismos ácido-lácticos ocorre a produção de ácidos (lático, fórmico, acético e propiônico) e queda considerável do pH;
- c) Estufamento: é provocado por bactérias ácido lácticas heterofermentativas (*Lactobacillus* e *Leuconostoc*) e algumas leveduras que produzem gás a partir da fermentação de açúcares;
- d) Esverdeamento dos pigmentos da carne: como resultado da oxidação química ou produção de água oxigenada, a coloração os hemepigmentos é alterada por vários tipos de bactérias ácido lácticas (especialmente *L. viridescens*).

A descoloração interna de origem microbiológica também ocorre no processamento de carnes curadas pela não eliminação dos microrganismos responsáveis por esta alteração.

3.3 Microrganismos patogênicos

Devido às características físico-químicas dos embutidos fermentados e do processo de fabricação, como o salame, este grupo de alimentos cárneos é considerado de severidade alta, mas com risco moderado embora não existam estudos epidemiológicos suficientes (Lücke, 2000).

Grande parte dos trabalhos realizados no Brasil sobre a qualidade microbiológica de salames foi desenvolvida na região Sul do País, focando principalmente a produção artesanal ou colonial (Pereira, 2004).

Entre os levantamentos realizados cita-se o realizado por Lobo, et al., (2001) que avaliou 60 amostras de salames coloniais coletadas em Santa Maria (RS), considerando impróprias para o consumo 66,67% delas. Em 65% das amostras a contagem de *Staphylococcus aureus* foi maior ou igual a 10^6 UFC/g.

Magnani, et al., (2000) analisaram 50 amostras de salames coloniais em Chapecó, Estado de Santa Catarina. Destas, 6% apresentaram *Salmonella* e 84% contaminação por

Escherichia coli.

Ritter, et al., (2003) realizaram um estudo no Rio Grande do Sul, com 13 amostras de salames coloniais, revelando a presença de coliformes fecais em mais de 50% das amostras e também uma amostra com contagem de *Staphylococcus aureus* da ordem de 10^5 .

Hoffman, et al., (1997) avaliaram amostras de salames industriais detectando *Salmonella* sp em 25% das amostras e em outras 25% as contagens de *S. aureus* foram da ordem de 10^4 UFC/g

3.4 Listeria

Listeria monocytogenes tem sido reconhecido como um importante patógeno por mais de sessenta anos. Contudo só foi identificada como um patógeno transmitido por alimentos após os anos 80, em decorrência de vários surtos de listeriose (Pelisser, et al., 2001). Esta bactéria tem ainda a capacidade de sobreviver em condições adversas de temperatura e pH (Jagannath, et al., 2001) e a detecção de células estressadas em alimentos é importante, pois injúrias sub-letais às células podem provocar aumento de sua patogenicidade (Zhinong, et al., 2006).

Segundo o Bacteriological Analytical Manual (FDA, 2004), o gênero *Listeria* é formado por seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* (subespécies *L. ivanovii ivanovii* e *L. ivanovii londoniensis*) e *L. grayi* (subespécies *L. grayi grayi* e *L. grayi murrayi*). Das seis espécies apenas *L. monocytogenes* é reconhecidamente patogênica para o homem e a listeriose associada à infecção por *L. ivanovii* e *L. seeligeri*, é extremamente rara em humanos.

Listeria monocytogenes foi inicialmente estudada e descrita por Murray e seus colaboradores de Cambridge em 1926, e relacionada com enfermidades em animais domésticos. Os autores propuseram inicialmente o nome *Bacterium monocytogenes* porque o “novo” microrganismo provocava alterações nas células sangüíneas de animais aumentando o número de leucócitos mononucleados (Bell e Kyriakides, 1998).

Com relação à estrutura celular e metabolismo, *L. monocytogenes* é um bacilo Gram-positivo, não-esporulado, anaeróbio facultativo a microaeróbio e de natureza psicotrófica. É uma bactéria parasita intracelular, cuja transmissão, amplamente

reconhecida, se dá através de alimentos contaminados (Almeida et al., 1999).

A listeriose é uma infecção oportunista que atinge principalmente os indivíduos mais vulneráveis da população (recém nascidos, anciãos, imunodeprimidos e mulheres grávidas, bem como seus fetos). Após a ingestão, a bactéria penetra pela parede gastrointestinal e então infecta tecidos normalmente estéreis. A invasão do tecido intestinal depende de vários fatores, incluindo o número de organismos consumidos, susceptibilidade do hospedeiro, e virulência da cepa ingerida. Todas as cepas de *L. monocytogenes* são patogênicas, porém a virulência, definida em estudos com animais, varia substancialmente (FAO/WHO, 2002).

Atualmente verifica-se que este microrganismo está envolvido com vários quadros clínicos graves como a meningite, abortos e septicemia com uma taxa de letalidade de 20 a 30% dos casos dependendo do grupo de risco os quais são mais bem relatados nos países mais industrializados (Rocourt, 1996).

Alguns estudos sugerem que até 21% dos humanos sejam portadores de *L. monocytogenes* nos intestinos, sendo encontrada mundialmente em pelo menos 42 espécies de mamíferos, tanto domésticos quanto silvestres, assim como em pelo menos 22 espécies de aves e também em algumas espécies de peixes e moluscos (Sakate, et al., 2003). Estima-se que 15% da população pertence ao grupo de risco da listeriose (Sofos e Yoon, 2006).

Estudos de Buchanan, et al., (1997), Chen, et al., (2004), citados por Sofos e Yoon (2006) indicam que se a contagem de células contaminastes em um alimento é inferior a 100 ufc/g a chance de infecção é considerada muito baixa. No mesmo trabalho Sofos e Yoon citam um trabalho de Houben e Eckenhausen (2006) que admite que mesmo para indivíduos do grupo de risco, a chance de desenvolvimento de listeriose é muito baixa quando a contagem de *L. monocytogenes* é inferior a 100 ufc/g.

As primeiras evidências de que a *L. monocytogenes* é um importante patógeno veiculado por alimentos foram levantadas e relatadas no início da década de 1980, quando ocorreram importantes surtos de listeriose humana, com altos índices de mortalidade. Até então este microrganismo não era tomado como importante patógeno relacionado com alimentos, principalmente porque os casos de surtos com outros microrganismos mais conhecidos eram muito mais freqüentes. Os alimentos envolvidos em tais surtos eram vegetais, laticínios, patês e frutos do mar (Harwing et al., 1991; McLauchlin, 1996 ab; Bell

e Kyriakides, 1998).

Dados do Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos informam que a incidência de listeriose diminuiu 32% no período de 1998 a 2005, sendo a taxa de ocorrência de 0,27 por 100.000 habitantes, entretanto a incidência aumentou em 2005 quando comparado com 2002. Em linhas gerais a taxa de ocorrência de listeriose é baixa, mas com uma taxa de mortalidade alta (CDC, 2006).

Os dados epidemiológicos brasileiros correlacionando o desencadeamento de doenças provocadas por *Listeria monocytogenes* através de alimentos são bastante escassos, mas as evidências da importância deste microrganismo como patógeno humano já são relatadas (Hofer, et al., 1998; Hofer, et al., 1999; Chesky, et al., 2000; Schwab e Edelweiss, 2003ab).

A análise das ocorrências de listeriose indica que os alimentos mais susceptíveis à presença de *Listeria* são: os preparados a partir de ingredientes crus não submetidos a cocção; que permitem a contaminação após o processamento; os armazenados sob refrigeração; cuja formulação permite o desenvolvimento deste microrganismo; com tempo de conservação prolongado, e alimentos prontos para o consumo (Bell e Kyriakides, 1998).

Segundo Sofos e Yoon (2006) a Análise de Riscos do “Center for Food Safety na Applied Nutrition” (CFSAN) do FDA e USDA-FSIS (2003) apresenta cinco categorias de risco:

- a) Risco muito alto: inclui produtos cárneos de delicatessen e salsichas que não são reaquecidas antes do consumo (estes produtos têm uma taxa de contaminação relativamente alta e permite o rápido crescimento de *L. monocytogenes* sob temperatura de refrigeração);
- b) Risco alto: inclui produtos muito gordurosos e outros produtos lácticos, leite pasteurizado, patê e “meat spread”, queijos moles não curados, frutos do mar defumados, leite não pasteurizado (estes produtos permitem o crescimento de *L. monocytogenes* durante o período de armazenamento sob refrigeração);
- c) Risco moderado: inclui crustáceos cozidos prontos para consumo; “deli salads”, embutidos fermentados secos e semi-secos, salsichas reaquecidas, queijos meio-duros, queijos curados moles, frutas e vegetais (muitos alimentos desta categoria são tratados com anti-microbianos no processamento e preparação ou frequentemente contém compostos capazes de inibir *L. monocytogenes*);

d) Risco baixo: inclui peixe preservado (salgado ou fermentado) e frutos do mar crus (este tipo de produtos têm uma contaminação moderada, vida de prateleira curta e são acidificados);

e) Risco muito baixo: inclui culturas lácteas, queijos duros, sorvetes e produtos lácteos congelados e queijos processados estes produtos são tratados com antimicrobianos e têm uma taxa de contaminação muito baixa).

Sofos e Yoon (2006) citam ainda o parecer de um grupo de especialistas do INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE E DO RISCK SCIENCE INSTITUTE, que classificou como alimentos de alto risco de contaminação por *L. monocytogenes* aqueles com as seguintes propriedades:

- a) Possuem potencial para a contaminação por *L. monocytogenes*;
- b) Permitem o crescimento de *L. monocytogenes* à grandes números;
- c) São prontos para consumo;
- d) Requerem refrigeração;
- e) São armazenados por um longo período.

3.5 Presença de Listeria em plantas de processamento de alimentos cárneos

Listeria monocytogenes é um microrganismo amplamente encontrado em ambiente agrícola (solo, vegetação, silagem, esterco, esgotos, água) como em ambiente de processamento de alimentos. É resistente a várias condições ambientais, tais como altas concentrações de sal e ácido, crescendo em baixas tensões de oxigênio e baixas temperaturas (FAO/WHO, 2003). Segundo Almeida et al., (1999) este patógeno é resistente a muitos agentes antimicrobianos e conservadores como sal (10%) e meios ácidos ou alcalinos (pH 5-9).

Sofos e Yoon (2006) relata que *L. monocytogenes* pode ser introduzida contaminando e estabelecendo-se em nichos e plantas de processamento de carnes prontas para consumo, onde pode sobreviver e persistir por longos períodos, inclusive anos, promovendo a contaminação cruzada em produtos apropriadamente cozidos, durante o corte ou embalagem. Portanto o controle deste patógeno é bastante difícil.

Em virtude dos esforços no controle de *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo o patógeno tem sido encontrado em plantas de processamento

contaminando alimentos prontos para consumo como carnes e aves cozidos onde equipamentos e superfícies de contato com alimentos podem servir como vetores para *L. monocytogenes* propagando-se durante a fabricação dos alimentos (Sofos e Yoon, 2006).

Sobrevivendo por longos períodos no ambiente, nos alimentos, nas plantas de processamento, e nos refrigeradores domésticos, é praticamente impossível garantir a ausência deste microrganismo no ambiente de fabricação, e a fim de produzir alimentos seguros, medidas devem ser tomadas para evitar que a *L. monocytogenes* se multiplique a níveis potencialmente perigosos (Bell e Kyriakides, 1998; FAO/WHO, 2002).

3.6 Presença de *Listeria* em embutidos crus fermentados

L. monocytogenes tem sido também isolada em alimentos como leite cru ou pasteurizado, queijos (particularmente nos queijos frescos), sorvete, vegetais crus, salames, carne de frango crua ou cozida, carnes cruas (todos os tipos) e em peixes crus ou defumados. Até mesmo quando presente inicialmente em baixos níveis em alimentos contaminados, o microrganismo pode se multiplicar durante o armazenamento, incluindo sob refrigeração, quando o alimento permite o crescimento (FAO/WHO, 2002).

A ocorrência de *L. monocytogenes* e outras espécies do gênero em produtos cárneos já é bem documentada. Segundo Johnson, et al., (1990) a incidência de *Listeria* em carne fresca pode variar de 0 a 68%, enquanto que em carne processada, incluindo produtos prontos para consumo, a contaminação é de 8 a 92%.

Jay (1996) compilou estudos realizados entre 1971 e 1994 por vários pesquisadores, obtendo os seguintes dados: na carne suína fresca ou congelada provenientes de doze países a taxa de positividade para *L. monocytogenes* variou de 0 a 94,7%, dependendo do país, sendo a taxa mais alta encontrada em amostras analisadas no Canadá. O total geral de positividade em carnes foi de 20%. A carne bovina e ovina teve presença de 16% no total geral, sendo 77% dos casos positivos provenientes de amostras exclusivamente bovinas do Canadá. As carnes de frango resfriadas e congeladas de 10 países apresentaram 17% de positividade para *L. monocytogenes*, sendo o maior índice (63%) de amostras da Malásia. No mesmo trabalho Jay relata que a presença deste patógeno em produtos cárneos processados varia consideravelmente entre os diversos tipos e origens, mas em torno de 13% eram positivas.

Hoffer e colaboradores (2000) realizaram um trabalho semelhante ao de JAY (1996), reavaliando cepas do gênero *Listeria* isoladas de diferentes fontes (humanos, animais, alimentos e ambiente, em um total de 3.112 amostras) entre 1971 a 1997, e verificaram que 74,9% das cepas isoladas em alimentos (n=2.330), 12,3% eram *L. monocytogenes*, 80,9% eram *L. innocua*, 1,58% *L. seeligeri*, 0,9% *L. welshimeri* e 0,1% *L. grayi*. Entre as cepas isoladas em alimentos 9,7% foram a partir de laticínios, 89,9% a partir de produtos cárneos, submetidos ou não a processos industriais e 0,25% a partir de vegetais. Grande parte das amostras provenientes de ambiente (88,8%) consistia de efluentes de plantas industrializadoras de carnes.

Em salames a ocorrência varia de 5 a 23% (Farber et al., 1988; Farber et al., 1991; Borges et al., 1999). Borges et al. (1999) cita que Simon Serra (1992) observou a incidência de 14,3% de *L. innocua* em amostras de embutidos crus curados enquanto não detectou a presença de *L. monocytogenes*. Benezet et al., (1993) reportam a ocorrência de 12,0% *L. monocytogenes* enquanto Gunasinghe et al., (1994) encontraram em 17,5% das amostras por eles analisadas.

Pouco se sabe, no Brasil e na América do Sul, sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* em embutidos cárneos fermentados, fatiados, embalados a vácuo. Por suas características de produção e armazenamento, estes produtos são potenciais veiculadores deste patógeno ao ser humano (Sakate et al., 2003).

Pesquisadores brasileiros (Destro et al., 1991) estudaram produtos cárneos e laticínios e verificaram a presença de *Listeria* em 100% das amostras de embutidos crus sendo que 80% das amostras apresentaram *L. monocytogenes* e 85% *L. innocua*. Borges et al., (1999) indicam a presença de 14,8% de *Listeria* sp nas amostras (n=81) por eles analisadas, onde 50% das amostras positivas apresentaram a presença de *L. monocytogenes* e 50% apresentaram a presença de *L. innocua* (salame tipo Italiano 13,3% de *L. monocytogenes* e 6,7% *L. innocua* e salame Tipo Milano 16,6% de *L. innocua*, as amostras de salame tipo Hamburguês e Friolano foram negativas para *Listeria* sp).

4 Medidas de controle de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos curados e fermentados

A habilidade dos microrganismos em sobreviver nos alimentos depende de vários parâmetros combinados tais como a temperatura, pH, sal e atividade água (Viallette et al., 2003).

Bactérias do gênero *Listeria* têm a capacidade de se multiplicar em matrizes simples, não apresentando exigências nutricionais específicas. O perigo de *L. monocytogenes* como risco associado com os alimentos, é em grande parte, devido à sua capacidade de se adaptar a condições inóspitas, tanto ao nível do ambiente exterior que antecede a ingestão dos alimentos, como também no interior do hospedeiro (Guerra e Bernardo, 2006).

A estabilidade microbiológica dos produtos cárneos fermentados, e o baixo risco de provocar doenças de origem alimentar são atribuídos à combinação e atuação dos diferentes fatores criados pelas culturas iniciadoras (produção de metabólitos secundários, diminuição do pH e do potencial redox), a alterações físicas que ocorrem devido às mudanças que ocorrem durante o processo de manufatura dos salames (diminuição da umidade e da atividade água) e presença cloreto de sódio e nitrato e/ou nitrito de sódio, que causam a inativação dos patógenos e deteriorantes durante o tempo de estocagem (Lücke, 2000; Prado, et al., 2000; Dabés, et al., 2001; Työppönen, et al., 2003; WHO/FAO, 2004; Thévenot et al., 2005).

Vários estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de verificar a ação de modificações de A_w , pH e a produção de metabólitos de bactérias ácido lácticas sobre a sobrevivência da *Listeria monocytogenes* e outros microrganismos patogênicos e deteriorantes.

4.1 Diminuição do pH

A concentração dos íons H^+ e OH^- exercem um papel significativo no funcionamento celular e na interação célula-ambiente (Jay, 2005).

A ação do pH sobre células microbianas vivas reside no efeito sobre o

funcionamento das enzimas e no transporte de nutrientes para o interior da célula. A membrana citoplasmática é relativamente impermeável aos íons H^+ e OH^- . Dessa forma, sua concentração no citoplasma permanece razoavelmente constante, apesar da grande variação de pH que pode ocorrer no meio que cerca a célula. Quando os microrganismos são expostos a um ambiente com pH abaixo ou acima da neutralidade, sua capacidade de proliferar depende da capacidade de modificar o pH do meio para um valor ou faixa ótima. Quando colocadas em ambientes ácidos, as células precisam evitar que íons H^+ entrem ou expeli-los numa velocidade maior que a de entrada. Em relação ao transporte de nutrientes, a célula bacteriana tende a possuir uma carga residual negativa. Desse modo, compostos não-ionizados conseguem entrar na célula, enquanto compostos ionizados não conseguem (Jay, 2005).

A resposta ácido-tolerante (ATR) é definida como a aquisição de resistência a condições ácidas letais depois de ser exposta a condições mediamente ácidas, portanto a ATR é um mecanismo de proteção induzido que aumenta a tolerância ao meio ácido (Bonnet e Montville, 2005).

Phan-Thanh et al., (2000) argumentam que devido a *Listeria* ser um microrganismo neutrófilo, seu crescimento nos alimentos é limitado pelo meio, e pela cepa e seu estado fisiológico.

Segundo Lou e Yousef (1999), embora não existam estudos que confirmem a capacidade de multiplicação de *L. monocytogenes* em pH inferior a 4,3, este microrganismo apresenta uma boa tolerância à acidez. Estudos sobre a sobrevivência de *L. monocytogenes* em pH inferior a 3,5 foram citados por Guerra e Bernardo (2006).

A capacidade de se multiplicar em pHs extremos é dependente de fatores como a temperatura de incubação, a natureza do agente acidificante e a composição do substrato (Koustsoumanis et al., 2005).

A relação entre a natureza química e concentração do agente acidificante adicionado ao meio e a capacidade de *L. monocytogenes* se multiplicar e sobreviver em meios com pH baixos tem sido largamente evidenciado. Os ácidos orgânicos fracos, como o acético, o cítrico, o láctico, o málico e o tartárico possuem uma ação bactericida relacionada com o grau de dissociação (pKa), sendo a forma não dissociada com maior ação bactericida (Guerra e Bernardo, 2006).

Os estudos de Wang e Johnson (1997) apontam o valor do pH como o fator

ambiental mais importante para o controle de *L. monocytogenes* nos alimentos. Em seus trabalhos verificaram que a taxa de sobrevivência e a multiplicação de *L. monocytogenes* está relacionada com o pH inicial do produto. As taxas mais altas de crescimento populacional ocorreram em pH igual ou superior a pH 6,0. Em pH abaixo de 5,0 não foi observado desenvolvimento e, em alguns casos o crescimento observado foi em escala inferior. Em alimentos ácidos (pH < 4,5) observa-se que este patógeno não sobrevive durante muitas semanas ao passo que em alimentos com menor acidez a tendência é para a sobrevivência ou crescimento.

Phan-Thanh et al., (2000) demonstraram o desenvolvimento de resistência de cepas de *L. monocytogenes* expostas inicialmente a condições ácidas sub-letais por algumas horas, e que, a extensão dessa adaptação adquirida depende do tempo de exposição às condições sub-letais.

Vários estudos demonstram que a virulência de cepas de *L. monocytogenes* pode diferir e que a patogenicidade deste microrganismo é afetada por vários fatores do substrato, neste caso alimentos e ambiente de processamento (Viallette et al., 2003).

O mecanismo de resposta ácido-tolerante é muito importante para a saúde pública, porque ela aumenta a capacidade de sobrevivência celular sob condições ácidas letais em habitats naturais, alimentos e hospedeiros e, aumentando dessa forma a virulência destas cepas (Bonnet e Montville, 2005).

Nissen e Holck (1998) citam que o baixo pH (4,6 – 5,0) e a baixa atividade água (0,87-0,90) inibem o crescimento da maioria das bactérias patogênicas, contudo estas bactérias podem não ser eliminadas, o que possibilita o isolamento de vários patógenos em embutidos fermentados. No mesmo trabalho os autores citam um levantamento empreendido no Canadá onde 24% das amostras de salames (n = 42) foram positivas para *L. monocytogenes* antes da fermentação, das quais 12% continuaram positivas após a maturação.

4.2 Atividade Água

Para seu metabolismo e multiplicação, os microrganismos exigem a presença de água na forma livre. A água ligada a macromoléculas por forças físicas não está livre para agir como solvente ou para participar de reações químicas e, portanto, não pode ser

aproveitada pelos microrganismos (Franco et al., 1996), assim os microrganismos devem competir com as moléculas de soluto pela água livre (Forsythe, 2002).

A atividade água (A_w) de um alimento representa a quantidade de água livre disponível aos microrganismos e é definida como a relação entre a pressão de vapor da água do substrato alimentício (P) e a pressão de vapor do solvente (P_0) a mesma temperatura, ou seja, $A_w = P/P_0$ (Silva, 2000).

O efeito procurado quando se diminui a atividade água de um alimento a um valor abaixo do ótimo é aumentar a duração da fase lag, reduzir a velocidade de crescimento e o tamanho da população final. Esses efeitos são resultantes da influência adversa da baixa quantidade de água sobre as atividades metabólicas, pois todas as reações químicas das células necessitam de um meio aquoso (Jay, 2005).

L. monocytogenes apresenta um crescimento populacional ótimo com A_w próximo de 0,97 e mínima de 0,92 (Forsythe, 2000). Guerra e Bernardo (2006) citam estudos que evidenciam a capacidade deste patógeno em se desenvolver em condições menos favoráveis e que o limite mínimo para seu desenvolvimento está relacionado como outros fatores de desenvolvimento, como a composição química do meio, temperatura e pH.

O cloreto de sódio e a sacarose são os dois compostos mais largamente utilizados para forçar a diminuição da atividade água, o sal adicionado às carnes e peixes e a sacarose em frutas (Forsythe, 2000). *L. monocytogenes* é um microrganismo halotolerante e sobrevive em elevadas concentrações de sal. Segundo Guerra e Bernardo (2006) estudos conduzidos por Seeliger (1961) demonstraram que algumas estirpes deste patógeno toleravam até 20% de NaCl ($A_w = 0,86$) durante curtos períodos de tempo mas que podiam permanecer viáveis após um ano em 16% de NaCl.

4.3 Atuação do Cloreto de Sódio

O cloreto de sódio atua desidratando e modificando a pressão osmótica na carne. Os efeitos dos níveis de sal no crescimento microbiano podem ser resumidos indicando que 5% de NaCl inibe completamente o desenvolvimento de bactérias anaeróbias, ao passo que não tem um efeito significativo nos aeróbios (p. ex. micrococos) e anaeróbios facultativos (p. ex. os estafilococos). A 10% de NaCl, o crescimento da maioria das bactérias é inibido, ainda que algumas espécies halotolerantes possam crescer em meios

que contenham até 15% de sal. Em salmouras com grandes quantidades de tecidos animais, o crescimento bacteriano ocorre principalmente na interface carne/salmoura (Ordóñez, 2005).

Listeria monocytogenes demonstra uma grande tolerância em altas concentrações de sal (Nightingale, 2006). Samelis e Metaxopolulos (1999) registram a sobrevivência de *L. monocytogenes* em concentrações de 12 a 13% de cloreto de sódio em matrizes cárneas.

4.4 Atuação de Nitratos e Nitritos

Os nitratos têm ação antimicrobiana contra as bactérias anaeróbias, representando para muitos microrganismos aeróbios uma fonte de nitrogênio. Entretanto, o nitrato por si só não possui um efeito bactericida/bacteriostático significativo, sua ação deve-se em maior parte aos nitritos resultantes, ao ácido nitroso gerado e aos ácidos que são produzidos a partir dele. A adição de ácidos fracos, glucona-delta-lactona e inoculação de lactobacilos potencializam a atividade dos nitritos (Ordóñez, 2005).

4.5 Interferência Microbiana

A Interferência Microbiana consiste na inibição ou destruição geral não específica de um microrganismo por outros do mesmo hábitat ou meio. O mecanismo geral de funcionamento da interferência microbiana não é completamente definido, mas alguns princípios já são aceitos. Primeiro, a biota natural deve ser maior em termos de células viáveis que o microrganismo a ser inibido, e segundo, a biota interferente normalmente não é homogênea, e os papéis específicos de cada espécie em particular não são esclarecidos. A interferência microbiana pode ser explicada pela competição por nutrientes, competição por sítios de adesão, alteração desfavorável do ambiente e pela combinação dos fatores anteriores (Jay, 2005).

Yokoyama et al., (1998) estudaram a interferência microbiana provocada por cepas de *L. innocua* sobre a sobrevivência e crescimento de populações de *L. monocytogenes*, verificando a produção de substâncias pela *L. innocua* que tem efeito inibitório sobre *L. monocytogenes*.

O antagonismo láctico é um exemplo específico da interferência microbiana e é definido como o fenômeno em que bactérias produtoras de ácido láctico inibem ou matam

bactérias relacionadas ou organismos causadores de deterioração em alimentos, quando em culturas mistas. Entre os fatores identificados estão antibióticos, peróxido de hidrogênio, diminuição do pH, redução de nutrientes, produção de diacetil, bacteriocinas e fatores tipo bacteriocinas (Jay, 2005).

As bacteriocinas são substâncias antimicrobianas de natureza protéica, semelhantes aos antibióticos e altamente específicas (tanto pelo organismo produtor, quanto sobre os microrganismos sobre os quais são letais) (Pelczar Jr 1997; Barreto et al. 2004). Uma espécie que produz uma determinada bacteriocina não é morta pela mesma, apesar de poder ser sensível a outras bacteriocinas (Pelczar Jr., 1997). Uma definição mais recente das bacteriocinas sugere que as mesmas poderiam ser consideradas como produtos primários ou substâncias modificadas no ambiente extracelular, liberadas a partir da síntese ribossomal bacteriana (Caplice e Fitzgerald, 1999). A maioria das bacteriocinas são moléculas pequenas, têm um alto ponto isoelétrico e contêm propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas (Barreto et al. 2004).

As bacteriocinas podem ser divididas em quatro grupos. O grupo I, dos antibióticos, é caracterizado por possuir aminoácidos não usuais como a dehidroalanina, deidrobutirina, lantionina e b-metilantiona. O grupo II é dividido em quatro subgrupos caracterizados por pequenos peptídios (>5 kDa) termoestáveis. No subgrupo IIa é que se enquadram as pediocinas PA-1 e AcH, sacacinas A e P, leucocina A, bavaricina MNe curvacina A, que possuem atividade contra *Listeria monocytogenes*. Os grupos III e IV diferem das demais bacteriocinas por serem formados por grandes proteínas termolábeis (>30 kDa). As bacteriocinas do grupo IV têm partes compostas por lipídeos ou carboidratos, porém sua função é desconhecida (Barreto et al., 2004).

Kosminsky et al., (1999) cita que a nisina é classificada como antibiótico, entretanto Meghrauset al., (1999) esclarece que ao contrário dos antibióticos, a nisina tem a vantagem de não induzir efeitos de resistência e ser tóxica, porque qualquer resíduo remanescente no alimento é digerido.

Isoladas ou em combinação com outros agentes antimicrobianos, as bacteriocinas atuam como ferramentas úteis na implantação de técnicas para a redução da carga de patógenos e/ou bactérias deteriorantes dos alimentos (Abriouel, 1998). A inclusão de culturas produtoras de bacteriocinas em alimentos fermentados é mais aceita do que o uso de preparações puras, visto que estas podem ser consideradas como aditivos alimentares

(McAuliffe, et al., 1998).

O uso de bacteriocinas em produtos cárneos fermentados tem mostrado resultados bastante satisfatórios, onde a sinergia com o nitrito de sódio tem efeito inibitório sobre esporos de *Clostridium perfringens* (Barreto, et al., 2004).

O uso de pediocina no controle da multiplicação e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em carnes fermentadas tem sido bastante relatado (Ross et al., 2002; Barreto et al., 2004).

Montville e Winkowski (1997) citados por Barreto, et al., (2004), mergulhando carne crua em uma solução de pediocina PA-1 na concentração de 5000 UA por mililitro observaram uma diminuição da viabilidade de *L. monocytogenes* em 100 vezes. Jack et al. (1996) inocularam *Listeria monocytogenes* em uma pasta de presunto contendo piscicolina 126, obtendo completa inibição do patógeno por até 14 dias de estocagem a 10°C. Vignolo et al. (2000) usando uma combinação de três bacteriocinas em um sistema de carne, preveniram o desenvolvimento de uma população de *Listeria*-bacteriocina-resistente. Martins e Franco (1997) estudaram o comportamento de cepas de *Leuconostoc* spp e *Lactobacillus sake* em lingüiças frescas, observando a atividade bacteriocina contra *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

Työppönen e colaboradores (2003) estudaram a ação bioprotetora que as culturas iniciadoras têm sobre embutidos cárneos fermentados obtendo bons resultados na diminuição da população de *L. monocytogenes*, entretanto os mesmos autores concluem que a redução da contagem deste patógeno não se deve apenas a produção de substâncias inibidoras, mas a um conjunto de fatores ambientais e ecológicos, requerendo maiores estudos. Estudos semelhantes foram conduzidos por Benkerroum et al., (2003) obtendo resultados também satisfatórios e verificando que os sais de cura (nitrito e nitrato) interferem na atividade das bacteriocinas produzidas por algumas bactérias ácido-lácticas.

Muitos estudos in vitro (Rodrigues et al., 1994; Nascimento, et al., 1994; Moreno et al., 1999; Prado et al., 2000; Moreno et al., 2000; Dabés et al., 2001; Alexandre et al., 2002) têm demonstrado que cepas de bactérias ácido-lácticas são capazes de inibir não somente a *Listeria monocytogenes*, como também outros patógenos de interesse na indústria de alimentos. Cabe ressaltar que tais cepas são obtidas em sua maioria de produtos que apresentam alta susceptibilidade à contaminação por *L. monocytogenes*, ou seja, produtos cárneos fermentados e laticínios fermentados.

O desenvolvimento de bactérias lácticas inibe diversos microrganismos indesejáveis e patogênicos, estendendo a vida útil, melhorando a qualidade higiênica e conferindo características sensoriais desejáveis nos alimentos. O aumento da segurança do produto é atribuído aos metabólitos desses microrganismos (ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, etc) e às substâncias produzidas, como os antibióticos e bacteriocinas (Prado et al., 2000).

4.6 Lactato de Sódio

A principal função dos conservantes é evitar o desenvolvimento e multiplicação de microrganismos que resultam nos processos de deterioração. O lactato de sódio é um sal produzido pela fermentação do açúcar, que vem sendo estudado como conservante para produtos cárneos e carcaças de frangos. É reconhecido como seguro e recomendado nos Estados Unidos pela Food and Drug Administration - FDA. No Brasil foi aprovado e registrado pelos Ministérios da Saúde e da Agricultura como aditivo umectante (Rodrigues et al., 2000).

Os efeitos bactericida e bacteriostático do lactato de sódio e lactato de potássio sobre *L. monocytogenes* têm sido avaliados e demonstrados.

Porto et al., (2002) avaliaram o efeito do lactato de potássio em salsichas durante sua vida de prateleira, verificando acentuada redução de *L. monocytogenes*.

Kathleen et al., (2002) avaliaram da mesma forma o efeito do lactato de sódio combinado ao diacetato de sódio em salsichas Viena e lingüiça Bratwurst, verificando um aumento na segurança microbiológica desses produtos principalmente em embutidos defumados.

Samelis et al., (2002) avaliaram a combinação de acetato de sódio, diacetato de sódio, glucona-delta-lactona e lactato de sódio sobre a contaminação superficial de salsichas por *L. monocytogenes*, obtendo resultados semelhantes e superiores aos obtidos com tratamento térmico.

Mbandi e Shelef (2002) observaram o efeito do lactato de sódio sobre *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. Stekelenburg (2003) observou o retardamento do desenvolvimento de *L. monocytogenes* em salsichas adicionadas de lactato de sódio e diacetato de sódio.

5 Referências Bibliográficas

ABRIOUEL, H et al. Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the bacteriocin as-48. **Applied Environment Microbiology**, v. 64, n.11, p. 4623-4626, 1998.

ALEXANDRE, D.P et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 4, p. 424-428, 2002.

ALMEIDA, P.F. et al. *Listeria monocytogenes*: importância e distribuição nos alimentos. **Higiene Alimentar**, v.13, n.64, p.19-23, 1999.

ASTIASARAM, I. Et al. Analysis of Proteolysis and Protein Insolubility during de Manufacture of Some Varieties of Dry Sausage. **Meat Science**, n 28, p.111-117, 1990.

BACUS, J. **Utilization of Microorganisms in Meat Processing – A handbook for meat plant operators**. Letchworth: Research Studies Press Ltd, 1984. 169p.

BARRETO, N; et al. Aplicação de bacteriocinas nos alimentos: Uma revisão. **Higiene Alimentar**, v. 18 n.126/127, p. 44-50, 2004.

BAUMGARTNER, P.A. et al. The influence of temperature on some parameters for dry sausage during ripening. **Meat Science**, n. 4, p. 191-201, 1980.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **Listeria – una a práctica al microorganismo y su control en los alimentos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1998. 173p.

BENEZET, A. et al. Investigación de *Listeria monocytogenes* en productos carnicos. **Alimentaria**, n. 247, p. 19-23, 1993.

BENKERROUM, N. et al. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw sausages (merguez) in presence of a bacteriocin-producing lactococcal strain as a protective culture. **Meat Science**, n. 63, p.479-484, 2003.

BONNET, M.; MONTVILLE, T. J. Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, n. 40, p.237-242, 2005.

BORGES, M.F. et al. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Salami. **Revista de Microbiologia**, n. 30, p. 362-364, 1999.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Copa, de Jerked Beef, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salame tipo Alemão, de Salame tipo Calabrês, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo Hamburguês, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano, de Lingüiça Colonial e Pepperoni. Instrução Normativa n° 22, de 31/07/2000. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico Sobre Aditivos Utilizados Segundo as Boas Práticas de Fabricação e suas Funções. Resolução n° 386, de 05 de agosto de 1999. Brasília. 1999.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1-2, p. 131-149, 1999.

CATÃO, R.M.R; CEBALLOS, B.S.O. *Listeria* spp., Coliformes Totais e Fecais e *E.coli* no leite Cru e Pasteurizado de uma Indústria de Laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 281-287, 2001.

CHESKY, M. et al. Polymerase Chain Reaction for the Laboratory Diagnosis of Aseptic Meningitis and Encephalitis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 58 n.3B. p. 836-842,

2000.

CHR HANSEN. **Culturas Microbianas para Carne**. Boletim Técnico 04. Valinhos, SP. 1987.14p.

CHR HANSEN. **Bactofermtm Meat Manual – Function and application of starter cultures for fermented sausages, Whole muscles: Dry, cured ham**. Pohlheim, 2001. 61p.

DABÉS, A.C. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 53, n.1, p.136-140 2001.

DESTRO, M.T. et al. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v. 2, n. 2, p. 110-112, 1991.

ENCINAS, J.P. et al. Behaviour of *Listeria* spp in naturally contaminated chorizo (Spanish fermented sausage). **International Journal of Food Microbiology**, n. 46, p. 167-171, 1999.

FARBER, J.M. et al. The presence of *Listeria* spp in raw milk in ontario. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 34, n. 2, p. 95-100, 1988.

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

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION / WORLD HELDTH ORGANIZATION. PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS. COMITÉ DEL CODEX SOBRE HIGIENE DE LOS ALIMENTOS Anteproyecto de Directrices para el Control de *Listeria monocytogenes* en los Alimentos. 35ª Reunión, Orlando, Flórida, EUA. 27 de janeiro a 1 fevereiro de 2002. disponível em: < www.codexalimentarius.net >. Acesso em: 20 janeiro 2006.

FORSYTHE, S. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. São Paulo: Ed. Artmed, 2002. 424p.

FRANCO, B. et al. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. 182p.

GALLI, F. Os embutidos – como fabricá-los. **Revista Nacional da Carne**. n. 194, p.16-28, 1993.

GERMER, S. P. M; MOURA, S. C. S. R. **Princípios de esterilização de alimentos**. Manual técnico nº 10. Campinas: ITAL, 1995. 123p.

GUERRA, M.M.; BERNARDO, F.A. Multiplicação e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* sob condições ecológicas desfavoráveis – parte I: Temperatura, acidez e Aw. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 139, p. 65-73, 2006.

GUNASINGHE, C. et al. Comparative-study of 2 plating media (Palcam and Oxford) for detection of *Listeria* species in a range of meat-products following a variety of enrichment procedures. **Letters in Applied Microbiology**. n. 18, p. 156-158, 1994.

HAMMES, W.P. et al. Lactic acid bacteria in meat fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 87, p. 165-174, 1990.

HARWIG, J. et al. *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Control**, v. 2, n. 2, p. 66-69, 1991.

HOFER, E. et al. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p. 173-177, 1998.

HOFER, C. et al. *Listeria monocytogenes* In Renal Transplant Recipients. **Revista da Instituto de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 375-377, 1999.

HOFER, E. et al. Species and Serovars of the Genus *Listeria* Isolated from Different Sources in Brazil from 1971 to 1997. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 615-620, 2000.

HOFFMANN L. F. et al. Estudo higiênico – sanitário preliminar de amostras de salame. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 47, p. 42 – 44, 1997.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos 6: Ecología microbiana de los productos alimentarios**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1998. 593p.

JACK, R.W. et al. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 171-200, 1995.

JAGANNATH, A. et al. Predictive model for the behavior of *Listeria monocytogenes* Scott A in Shrikhand, prepared with a biopreservative, pediocina K7. **Food Microbiology**, n. 18, p. 335-343, 2001.

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

_____. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª Edição. Porto Alegre: ArtMed Editora, 2005. 711p.

JOHNSON, J.L. et al. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp in meat and meat products. **Journal of Food Protection**, n. 53, p. 81-91, 1990.

KATHLEEN, A. G. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Sodium Diacetate and Sodium Lactate on Wieners and Cooked Bratwurst. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 1, p. 116-123, 2002.

KOSMINSKY, G.R. et al. Avaliação da sensibilidade de microrganismos selecionados a

diferentes concentrações de nisina em salsichas comum e de frango. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 63, p. 53-63, 1999.

KOUTSOUMANIS, K.P.; SOFOS, J.N. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, n.104, p. 83-91, 2005.

LAWRIE, R.A. **Ciência da Carne**, 6ª. Ed. Porto Alegre: ArtMed, 2005. 384p.

LIZASO, G. et al. Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, a Spanish dry cured sausage. **Food Microbiology**, n. 16, p. 219-228, 1999.

LOBO V. M. et al. Avaliação microbiológica de salames coloniais comercializados no município de Santa Maria – RS. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 88, p. 57 – 61, 2001.

LOU, Y.; YOUSEF, A.E. Adaptation to sublethal environmental stress protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. **Applied Environment Microbiology**, n. 63, p. 1252-1255, 1999.

LÜCKE, F.K. Quality and safety issues in fermented meat products. Lecture presented at the Join Meeting of the Society of Applied Microbiology (UK) and the Estonian Society for Microbiology on “ Microbiological Safety of Food” Tartu (Estonia), 10-11 may 2000. disponível em: < http://www.fh-fulda.de/fileadmin/Fachbereich_OE/Download/Profs/FKL/tartu.pdf > Acesso em: 22 agosto 2003.

_____ Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science** n. 56, p. 105-115. 2000.

MAGNANI L. A., et al. Incidência de *Salmonella* e *Escherichia coli* em carne suína *in natura* e salame colonial, consumidos pela população de Chapecó – SC. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 73, p. 44 – 47, 2000.

MARTINS, E.C.P.; FRANCO, B. Inhibition of foodborne pathogens by bacteriocin-producing *Leuconostoc* sp and *Lactobacillus sake* isolated from “lingüiça frescal”. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 4, p. 284-287, 1997.

MBANDI, E.; SHELEF, L.A. Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef bologna. **International Journal of Food Microbiology**, n. 76, p. 191-198, 2002.

McAULIFFE, O. Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. **Applied Environment Microbiology**. v. 64, n. 2, p. 439-445, 1998.

McLAUCHLIN, J. The role of the Public Health Laboratory Service in England and Wales in the investigation of human listeriosis during the 1980s and 1990s. **Food Control**, v. 7, n. 4/5, p. 235-239, 1996a.

_____ The relationship between *Listeria* and Listeriosis. **Food Control**, v. 7, n. 4/5, p. 187-193, 1996b.

MORENO, I. et al. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNR 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 23-28, 1999.

_____ Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. **Brasilian Journal of Microbiology**, n. 31, p. 184-192, 2000.

NASCIMENTO, M.G.F. et al. In vitro activity of naturally occurring peptides (defensins) against *Listeria monocytogenes*. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n.4, p. 440-445, 1994.

NIELSEN, J.W. et al. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. **Applied Environment Microbiology**, n. 56, p. 2142-2145, 1990.

NIGHTINGALE, K.K. et al. Validation of Traditional Italian-Style Salami Manufacturing Process for Control of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 4, p. 794-800, 2006.

NISSEN, H.; HOLCK, A. Survival of *Escherichia coli* o157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella kentuckyin* Norwegian fermented, dry sausage. **Food Microbiology**, n. 15, p. 273-279, 1998.

OLIVEIRA, K.; MENDONÇA, R. Efeito da fermentação sobre a microbiologia de embutidos cárneos. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 123, p. 12-17, 2004.

ORDÓÑEZ, J.A. et al. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. n. 39, p. 329-367, 1999.

ORDÓÑEZ-PEREDA, J.A. et al. **Tecnologia de Alimentos - Alimentos de Origem Animal**. Vol. 2. São Paulo: Ed. Artmed, 2005. 279p.

PARDI, M.C. et al. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. Volume II. Goiânia: Editora da UFG, 2001. 1147p.

PELCZAR Jr, J.M. et al. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Vol I. 2ªed. São Paulo: Makron Books, 1997. 524p.

PELISSER, M.R. et al. Detection of *Listeria* species in refrigerated chicken carcasses using Clearview™ and a modified conventional culture method. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 32, p. 113-116, 2001.

PEREIRA, K. S. Patógenos bacterianos em salames. **Revista Nacional da Carne**, ed. 328,

2004. disponível em: < <http://www.dipemar.com.br> > Acesso: 26 janeiro 2006.

PHAN-THANH, L. et al. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, n. 55, p. 121-126, 2000.

PORTO, A. et al. Viability of five-strain mixture of *Listeria monocytogenes* in vacuum-sealed packages of Frankfurters, commercially prepared with and without 2.0 or 3.0% added potassium lactate, during extended storage at 4 and 10°C. **Journal of Food Protection**, n. 65, v. 2, p. 308-315, 2002.

PRADO, C.S. **Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas de embutidos curados, frente a *Listeria monocytogenes***. 1996. 64p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1996.

PRADO, C.S. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 52, n. 4, p. 417-423, 2000.

RITTER R., et al. Microbiologia contaminante e patogênica de lingüiça (salame) colonial, analisada em quatro períodos distintos. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 113, p. 60 – 66, 2003.

ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. **Food Control**, v. 7, n. 4/5, p. 195-202, 1996.

RODRIGUES, J.M. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sake* strains of meat origin. **Meat Science**, n. 38, p. 17-26, 1994.

RODRIGUES, R. et al. Lactato de Sódio – Um conservante natural no processamento de lingüiça frescal. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 75, 56-61, 2000.

ROSS, R.P. et al. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, n. 79, p. 3-16, 2002.

SAKATE, R. I. et al. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 53, n. 2, p. 184-187, 2003.

SAMELIS, J. et al. Stability and safety of traditional Greek salami – a microbiological ecology study. **International Journal of Food Microbiology**, n. 44, p. 69-82, 1998.

SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and meat processing plant. **Food Microbiology**, n. 16, p. 465-477, 1999.

SAMELIS, J. et al. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobial after postprocess contamination and extended storage of frankfurters at 4°C in vacuum packages. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 2, p. 299-307, 2002.

SCHWAB, J.; EDELWEISS, M. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécies de aborto pela técnica imunoistoquímica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 2, p. 111-114, 2003a.

SCHWAB, J.; EDELWEISS, M. (b) Identificação Imuno-histoquímica de *Listeria monocytogenes* em Placentas Fixadas em Formol e Embebidas em Parafina. **RBGO**, v. 25, n. 7, p. 501-505. 2003b.

SOFOS, J.N.; YOON, Y. Safer food using predictive modeling. **Fleischwirtschaft International**, n. 3, p. 16 - 21. 2006.

STEKELENBURG, F.K. Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* in Frankfurter sausage by the addition of potassium lactate and sodium diacetate mixtures. **Food Microbiology**, n. 20, p. 133-137, 2003.

SILVA, J.A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Ed. Livraria Varela, 2000. 231p.

TERRA, A. B. M. et al. **Particularidades na Fabricação de Salame**. São Paulo: Ed. Livraria Varela, 2004. 152p.

THÉVENOT, D. et al. Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. **International Journal of Food Microbiology**, n. 101, p. 189-200, 2005.

TYÖPPÖNEN, S. et al. Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. **Food Control**, n. 14, p. 181-185, 2003.

U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical Manual - Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. U.S. Department of Health and Human Services. 2004. Disponível em: < <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html> > Acesso em: 25 setembro 2005.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food – 10 States, United States, 2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 55 (14):392-395. 2006. disponível em: < <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm5514.pdf> > Acesso em: 07 agosto 2006.

VIALETTE, M. et al. Growths kinetics of clinical and seafood *Listeria monocytogenes* isolates in acid and osmotic environment. **International Journal of Food Microbiology**, n. 82, p. 121-131, 2003.

VIEIRA, E.N.R.; MENDONÇA, R.C.S. Leveduras em embutidos fermentados: opção tecnológica. **Revista Nacional da Carne**, ed. 340, 2005. Disponível em: <http://www.dipemar.com.br>. 2005. Acesso em: 21 abril 2006

VIGNOLO, G. et al. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. **Current Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 410-416, 2000.

WANG, L.L.; JOHNSON, E.A. Control of *Listeria monocytogenes* at refrigeration Temperatures. **Journal Applied Bacteriology**, n. 68, p. 157-162, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION & FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food**. Microbiological Risk assessment series 4, 2004. 48p.

YOKOYAMA, E. et al. Production of bacteriocin-like-substance by *Listeria innocua* against *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Microbiology**, n. 40, p. 133-137, 1998.

ZHINONG, Y. et al. A Solid Agar Overlay Method for Recovery of Heat-Injured *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 2, p. 428-431, 2006.

**CAPÍTULO 2 - Artigo: SOBREVIVÊNCIA DE LISTERIA MONOCYTOGENES
EM SALAME TIPO ITALIANO DE BAIXA ACIDEZ, PRODUZIDO SOB
CONDIÇÕES BRASILEIRAS DE FABRICAÇÃO**

SOBREVIVÊNCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM SALAME TIPO ITALIANO DE BAIXA ACIDEZ, PRODUZIDO SOB CONDIÇÕES BRASILEIRAS DE FABRICAÇÃO

Roberto Degenhardt¹ e Ernani S. Sant`Anna^{1*}

¹ Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

*Corresponding Author. Mailing address: Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Ademar Gonzaga, 1346, Itacorubi. 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil. Tel.: (+5548) 331-5372, Fax: (+5548) 331-9943. e-mail: ernanis@cca.ufsc.br

ABSTRACT:

Salamis have been considered products ready for consuming with low risk of causing listeriosis due to hurdles created during the manufacturing process and its low values in pH and a_w , high salt concentration and the presence of lactic acid bacteria (LAB). Even so, the survival of *Listeria monocytogenes* in these products have been reported and studies aiming the decreasing of this pathogen contamination give evidence that the ranging of process parameters, LAB and *L. monocytogenes* strains directly influence the results. In this work, three formulations (one standard formulation, one formulation added of *L. plantarum* and one added of 2% sodium lactate) using the manufacturing process usually employed in Brazil were evaluated. Naturally contaminated sausages presented a small increasing in *L. monocytogenes* population on the first days of the process, followed by a decreasing until the end of the process. The artificially contaminated salamis had considerable reduction of the initial and final counting of *L. monocytogenes* not having significant differences between the treatments.

Key-words: *Listeria monocytogenes*; *Lactobacillus plantarum*; Fermented dry sausage; Survival, Brazilian salami.

RESUMO:

Salames têm sido considerados produtos prontos o para consumo com baixo risco de provocar listeriose devido aos obstáculos criados no processo de fabricação e suas características de pH e atividade água baixos, alta concentração de sal e presença de bactérias lácticas. Entretanto, a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* nesta classe de produtos é verificada e estudos de processo visando à redução da contaminação por este patógeno, têm demonstrado que particularidades como variação dos parâmetros de processo, cepas de bactérias lácticas e de *L. monocytogenes* influenciam diretamente os resultados. Neste estudo três formulações foram avaliadas (uma padrão, uma com inoculação da cultura *Lactobacillus plantarum* e outra com adição de 2% de lactato de sódio) empregando parâmetros de processo comumente praticados no Brasil. Os salames naturalmente contaminados apresentaram discreto aumento da população de *L. monocytogenes* no início do processo, seguidos por redução até o final da maturação. Os salames artificialmente contaminados tiveram redução considerável da contagem de *L. monocytogenes* não havendo diferenças significativas entre os tratamentos.

PALAVRAS CHAVE: *Listeria monocytogenes*; *Lactobacillus plantarum*; embutido seco fermentado; sobrevivência, salame brasileiro.

INTRODUÇÃO

Salames são embutidos fermentados e dessecados, preparados a partir de carne suína, toucinho, sal, agentes de cura e especiarias, sem tratamento térmico severo, e devido sua forma de consumo, é considerado um produto pronto para consumo, pois não necessita tratamento térmico posterior (5; 10; 18; 22). Os processos de fabricação de salames variam consideravelmente em função da região produtora e preferência do consumidor (1; 8; 25;28).

Durante a fermentação por bactérias ácido-lácticas, o oxigênio presente na massa é consumido, diminuindo o potencial redox, tornando o nitrito mais efetivo na inibição das bactérias deteriorantes e patogênicas. Além disso, a queda do pH provoca a diminuição da capacidade de retenção de água pelas proteínas, acelerando a secagem do salame. A secagem por sua vez resulta em uma baixa atividade água do produto final e aumento na concentração de NaCl (30; 31). Por estas razões produtos cárneos fermentados têm sido tradicionalmente considerados relativamente seguros devido a estes fatores intrínsecos e extrínsecos (23).

Listeria monocytogenes tem sido considerado o patógeno mais importante veiculado por alimentos devido à alta taxa de mortalidade que provoca em grupos de risco (29) e, embora durante a fermentação e maturação, a contagem deste patógeno tende a diminuir substancialmente devido aos obstáculos que são criados (8; 30), é freqüentemente isolado em produtos cárneos fermentados, pois é capaz de sobreviver às condições adversas do processo de fabricação comercial de salames (2; 12; 33) devido a um sofisticado mecanismo de resposta ao *stress* ácido, osmótico e térmico (3).

Neste estudo foi avaliada a sobrevivência de *L. monocytogenes* em salames tipo Italiano, de baixa acidez, fabricados sob as condições brasileiras de produção, e em presença de fatores inibidores intencionalmente adicionados.

MATERIAL E MÉTODOS

As matérias primas cárneas, condimentos e insumos foram obtidos junto a uma

planta de abate e industrialização de suínos, em Videira, SC. A cultura comercial de *Lactobacillus plantarum* (Holbac 100™) foi obtida junto a Danisco Brasil LTDA.

Preparação dos inóculos

A cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (OXOID C3970L) foi re-suspendida em Caldo Infusão de Cérebro e Coração - BHI (Brain Heart Infusion, MERCK 1.10493) e incubada em *overnight* a 36°C. A cultura foi repicada para Agar Trypticase de Soja - TSA (Tryptic Soy Agar, OXOID CM 131) e mantida sob refrigeração (2 a 8°C). O inóculo utilizado nos testes foi preparado com antecedência de 12 horas, cultivando-se preliminarmente a cepa em caldo BHI, *overnight*, e posteriormente diluindo-se em solução salina 0,85%. Transferiu-se inicialmente 100 µL da cultura em caldo BHI para 9,9 mL de solução salina e homogeneizada por um minuto, 1000 µL da primeira diluição foi transferida para 9,0 mL de solução salina e homogeneizada por mais um minuto. A cultura diluída foi mantida sob refrigeração até o momento do uso e a contagem de células viáveis do inóculo foi de 10⁴ UFC mL⁻¹.

Preparação dos Salames

Foram elaboradas três formulações de salame. Uma formulação padrão, sem adição de inibidores, uma formulação com adição de cultura de *Lactobacillus plantarum* e uma formulação com adição de 2% de Lactato de Sódio. Cada formulação teve uma batelada contaminada artificialmente com *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e uma batelada controle, conforme a Tabela 1. Os testes foram realizados em duplicata.

Tabela 1: Codificação das formulações de salame Tipo Italiano preparadas para verificar a sobrevivência de *Listeria monocytogenes*.

Formulação	Codificação dos Tratamentos	Descrição dos Tratamentos
A - Controle	A1	Formulação padrão
	A2	Formulação padrão + <i>L. monocytogenes</i>
B - <i>Lactobacillus plantarum</i>	B1	Formulação + <i>L. plantarum</i>
	B2	Formulação + <i>L. plantarum</i> e <i>L. monocytogenes</i>
C - Lactato de sódio	C1	Formulação + Lactato de sódio
	C2	Formulação + Lactato de sódio e <i>L. monocytogenes</i>

Foram preparadas seis bateladas (A1; A2; B1; B2; C1; C2) de massa base com a seguinte composição: Carne suína (paleta) 74,9%, toucinho 16,0%, sal 2,8%, pó húngaro III (nitrato de sódio e nitrito de sódio) 0,3%, eritorbato de sódio 0,04%, glutamato

monossódico 0,25%, malto dextrina 0,5%, leite em pó 4,0%, glucona delta lactona (GDL) 1,2%, cultura de *Staphylococcus carnosus* (BACTOFERM SB 61 - Chr. Hansen®) 0,025%.

Uma massa-liga foi preparada com 15% da carne suína e 10% do sal total utilizados em cutter (MADO Ganrant®). Em seguida acrescentou-se ao cutter o toucinho congelado e moído até que atingisse a metade da granulometria desejada. Então se adicionou o restante da carne suína congelada, o inóculo de *L. monocytogenes* (bateladas A2, B2 E C2), as culturas, temperos e aditivos, continuando-se a moagem até uma granulometria de aproximadamente 5 mm x 5 mm. A massa foi embutida em tripas de colágeno de 43mm por meio de embutideira (Heinrich Frey Maschinenbau GmnH – Henry 20®) formando peças de 350 – 400 g. As peças foram penduradas em varas e levadas à cura.

Nas bateladas B1 e B2 foram acrescentados 0,025% de Holbac 100™ (DANISCO), dissolvidos em 50mL de água destilada, e nas bateladas C1 e C2 foram acrescentados 2,0% de lactato de sódio (Purasal – PURAC).

Parâmetros tecnológicos

A fermentação e maturação foram realizadas em câmara climatizada (Reich®). Para o desenvolvimento das reações de cura manteve-se os salames à temperatura de 22-24°C, umidade 94-98% por 48 h. Posteriormente, para a secagem e maturação manteve-se nas condições de temperatura e umidade conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros tecnológicos de cura e maturação

Dias	Temperatura (C°)	Umidade Relativa (UR%)
1° e 2°	22 – 24	94 – 98
3°	20 – 22	92 – 96
4°	18 – 20	90 – 94
5°	16 – 18	88 – 92
6°	12 – 14	85 – 90
7° ao 28°	12 – 14	82 – 87

Análises microbiológicas

Foram avaliadas amostras de cada batelada com 0, 7, 14, 21 e 28 dias de processo. Prepararam-se unidades analíticas de 25 g diluídas em 225 mL de Água Peptonada Tamponada – (Buffered Peptone Water, OXOID CM 509), homogeneizadas em Stomacher

400 (Modelo Seward Medical , Inglaterra), e as diluições subseqüentes também foram feitas com água peptonada tamponada e homogeneizadas em agitador de tubos vortex (PHOENIX mod. AP 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil). A contagem de *Listeria monocytogenes* foi determinada pelo método do Número Mais Provável (NMP), (5 séries de 3 tubos - 1,0 g, 0,1 g, 0,01 g, 0,001 g e 0,0001 g), utilizando Caldo Universidade de Vermont - UVM (Modified *Listeria* Enrichment Broth, ACUMEDIA 7409A) para enriquecimento primário (incubação a 30°C por 24 h), Caldo Fraser (ACUMEDIA 7502A) como enriquecimento secundário (incubação a 35°C por 48 h), e Agar *Listeria* acc. to Ottaviani & Agosti - ALOA (BIOLIFE cód. 401605) como meio de isolamento e diferencial (incubação a 35°C por 24-48 h) (32). As colônias características de *L. monocytogenes* (3 a 5 colônias) foram confirmadas através das provas de catalase, motilidade por microscopia (32) , CAMP Test (Tryptic Soy Agar OXOID, CM 131, adicionado de sangue de carneiro - NEWPROV), fermentação de rhamnose (Phenol-red Broth Base, MERCK 1.10987; L(+) Rhamnose MERCK 1.04736) e com o soro *Listeria O Antisera Types 1, 4* (DIFCO cód. 223021). A contagem de bactérias lácticas foi determinada com Ágar De Man, Rogosa, Sharpe - MRS (OXOID CM 361) incubado à temperatura de 30°C por 48-72 horas em atmosfera microaerófila (26). As colônias típicas foram confirmadas através de provas de catalase.

Análises físico-químicas

As amostras foram moídas e homogeneizadas em moedor adequado com disco de 5mm. O pH foi determinado com potenciômetro ORION (mod. 410 – 060547). A atividade água foi determinada por cálculo entre os percentuais de água e sal conforme a metodologia de Krispien, Rödel e Leistner (15). A umidade foi determinada por evaporação pelo método gravimétrico a 105°C e os cloretos foram determinados pelo Método Mercurométrico através da titulação com nitrato de mercúrio (4).

Análise estatística

Foram realizadas três repetições de cada tratamento. Os resultados das determinações de *Listeria monocytogenes* foram expressos em log₁₀ NMP/g e as contagens

de bactérias ácido-láticas expressas em $\log_{10}\text{UFCg}^{-1}$. Os dados de pH, A_w , NMP de *Listeria monocytogenes* e contagem de bactérias ácido-láticas foram analisados utilizando o software *Statistica* versão 6.0 através da análise de variância (ANOVA) e o Teste de Tukey foi aplicado quando detectada diferença entre os valores ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

pH e Atividade Água

Os valores de pH e atividade água (Tabela 3) não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos. A queda do pH teve o desempenho característico do processo de fabricação de salames brasileiros com redução acentuada até o 14º dia seguido por uma elevação no 21º dia mantendo-se constante até o 28º dia da maturação. Este efeito ocorre pela atividade das bactérias ácido-láticas e a elevação do pH próximo ao final do processo é devido à proteólise e lipólise, provocada provavelmente por leveduras, que também são responsáveis pelo desenvolvimento do aroma, característico da maturação (19; 29, 34).

A diminuição de atividade água de todos os tratamentos teve comportamento semelhante, mas a partir do 14º dia a curva dos tratamentos *C1* e *C2* distanciaram-se das demais, permanecendo entre o 21º e 28º dia de maturação com valores menores que os demais tratamentos. Este fato pode estar associado ao efeito umectante do lactato de sódio, que aumenta a capacidade de retenção da água acarretando na diminuição da atividade água (24).

Contagem de Bactérias Lácticas

As populações de bactérias lácticas presentes neste estudo, com exceção dos Tratamentos *B1* e *B2*, são originadas da contaminação da matéria prima e do ambiente de processamento, onde a contagem é muito variável. A contagem oscilou entre 5,0 e 7,0 \log_{10}/g , não havendo diferença significativa ($p > 0,05$), com exceção do Tratamento *A1*. A variação da contagem de bactérias ácido láticas entre os tempos de processo demonstrou

diferença significativa ($p < 0,05$) apenas no Tempo 0, devido a população ser menor em relação aos demais tempos, e esta aumentar durante a fermentação e maturação.

Tabela 3: Resultados de contagens de bactérias ácido-lácticas (LAB), pH and atividade água (A_w) durante o período de cura e maturação de salames.

Tratamento	0 dias			7 dias			14 dias			21 dias			28 dias		
	LAB	pH	A_w	LAB	pH	A_w	LAB	pH	A_w	LAB	pH	A_w	LAB	pH	A_w
A1	5,00	5,61	0,958	5,97	4,99	0,938	6,88	4,93	0,916	6,35	5,08	0,895	5,80	5,16	0,892
A2	5,48	5,74	0,959	6,43	5,03	0,941	6,80	4,82	0,917	6,37	5,12	0,901	6,40	5,12	0,897
B1	6,21	5,62	0,958	6,87	5,08	0,939	7,34	4,89	0,917	7,05	5,03	0,898	6,95	5,17	0,895
B2	6,17	5,74	0,958	6,85	5,07	0,940	7,24	4,91	0,917	7,03	5,06	0,899	6,78	5,19	0,896
C1	6,00	5,60	0,959	6,74	5,06	0,937	6,60	4,76	0,915	6,40	5,07	0,885	6,00	5,19	0,883
C2	6,26	5,36	0,959	6,98	5,08	0,937	6,93	4,84	0,915	6,59	5,15	0,885	6,43	5,10	0,883

A1: Tratamento A1 = Formulação padrão; A2: Tratamento A2 – Formulação padrão inoculada com *L. monocytogenes*; B1: Tratamento B1 – Formulação padrão inoculada com *L. plantarum*; B2: Tratamento B2: Formulação padrão inoculada com *L. plantarum* e *L. monocytogenes*; C1: Tratamento C1 – Formulação padrão com 2% de Lactato de sódio; C2: Tratamento C2 – Formulação padrão com 2 % de Lactato de sódio inoculada com *L. monocytogenes*.

Sobrevivência de *L. monocytogenes* em amostras controle

Os tratamentos *A1*, *B1* e *C1*, (Figura 1) representam o comportamento da população de *Listeria monocytogenes* presente na matéria prima (contaminação natural) utilizada na produção do salame tipo Italiano.

Verificou-se neste estudo que as contagens de *L. monocytogenes* nos salames controle são bastante baixas e estão em acordo com trabalhos semelhantes de Peccio (20) e Silva (27).

As curvas do tratamento *A1* e *B1* tiveram comportamento diferenciado entre si. O tratamento *B1* apresentou um nível de contaminação inicial maior que o tratamento *A1* e *C1*, e do início ao final do processo apresentou uma diferença de $2,42 \log_{10}$. O comportamento desta curva demonstrou uma queda constante até o 14º dia de maturação, e uma discreta elevação no 21º dia seguido de uma queda acentuada no 28º dia de maturação. O tratamento *A1*, embora apresentando uma diferença discretamente menor entre o início e o final do processo ($0,04 \log_{10}$), teve um crescimento sensível ($1,05 \log_{10}$) na fase de fermentação até o 7º dia, seguido de queda não sendo detectado no 14º e 21º dia e apresentando um discreto aumento no 28º dia. Este comportamento é semelhante ao descrito por Campani et al. (6) quando compararam o efeito de duas cepas de *Lactobacillus plantarum*, uma produtora de bacteriocina e outra não, sobre a sobrevivência de *L.*

monocytogenes, no processo de fabricação de salame Italiano. O crescimento da população no tratamento A1 na primeira semana pode ser explicado por uma reação ao ambiente que gradativamente tornou-se mais ácido e pela ausência de obstáculos fortes. Este comportamento é esperado em cepas adaptadas ao *stress* ambiental provocado pelo processo (21; 35).

O tratamento C1 não apresentou contagens de *L. monocytogenes*, ao longo do período de avaliação. Este comportamento pode ser decorrente da contaminação da matéria prima estar abaixo dos níveis de detecção do método de contagem utilizado ou um efeito preventivo do lactato de sódio que não permitiu o crescimento da população.

Sobrevivência de *L. monocytogenes* em amostras artificialmente contaminadas

O comportamento das populações de *L. monocytogenes* nos salames artificialmente contaminados, nos tratamentos A2, B2 e C2, podem ser verificados na Figura 2. Todos os tratamentos apresentaram curvas com diminuição contínua da população não havendo diferenças significativas entre elas ($p>0,05$). A diferença obtida entre as populações iniciais e finais no Tratamento A2 foi de 2,57 \log_{10} , no Tratamento B2 de 3,81 \log_{10} e Tratamento C2 de 3,3 \log_{10} .

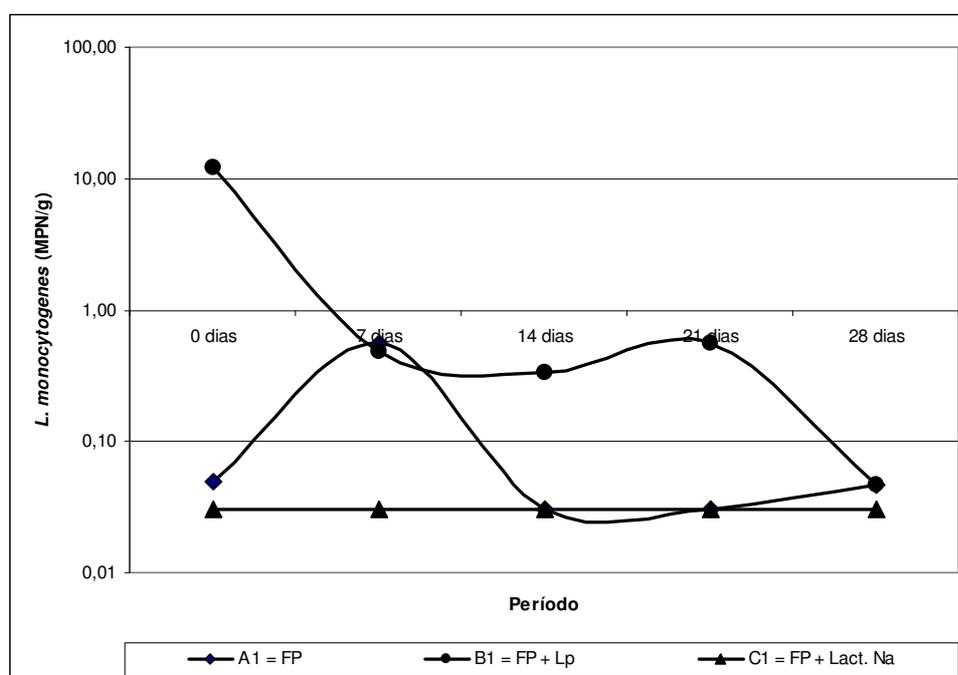


Figura 1: Sobrevivência de *L. monocytogenes* em salames tipo Italiano controle, ao longo da fermentação e maturação. A1 = FP: Tratamento A1 – Formulação padrão; B1 = FP + Lp: Tratamento B1 – Formulação padrão inoculada com *L. plantarum*; C1 = FP + Lact. Na: Tratamento C1 – Formulação padrão com 2% de Lactato de sódio.

Comparando-se os dois tratamentos da formulação padrão (tratamento A1 com contaminação natural, e tratamento A2 com contaminação artificial), verificou-se comportamentos diferentes entre as duas curvas. Enquanto o tratamento A1, que teve uma contagem de *L. monocytogenes* inicial menor, apresentou crescimento na primeira semana, seguido de queda posterior, o tratamento A2, com população inicial maior, teve queda mais acentuada na primeira fase, e contínua até o final do processo. Esta diferença pode ser devida às características da cepa presente em cada processo. O tratamento A2 foi elaborado com uma cepa controle (ATCC 7644) de origem humana, e no tratamento A1, estava presente uma ou mais cepas de *L. monocytogenes* originária de matéria prima cárnea e/ou ambiente de processo de carnes.

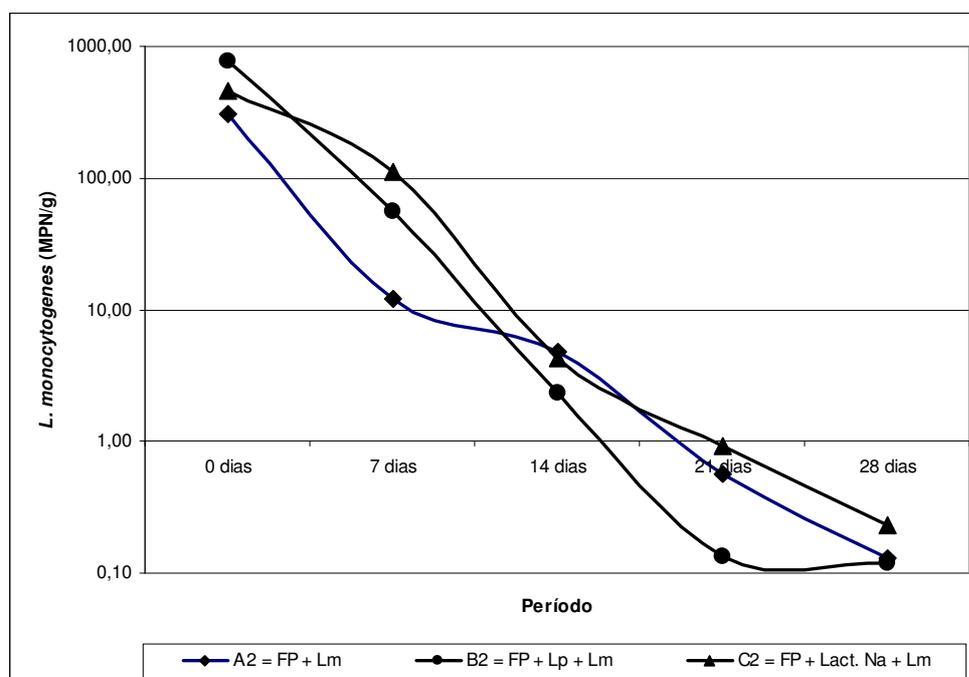


Figura 2: Sobrevivência de *L. monocytogenes* em salames tipo Italiano artificialmente contaminados, ao longo da fermentação e maturação. A2 = FP + Lm: Tratamento A2 – Formulação padrão inoculada com *L. monocytogenes*; B2 = FP + Lp + Lm: Tratamento B2: Formulação padrão inoculada com *L. plantarum* e *L. monocytogenes*; C2 = FP + Lact. Na + Lm: Tratamento C2 – Formulação padrão com 2 % de Lactato de sódio inoculada com *L. monocytogenes*.

O tratamento B2, cuja formulação continha a cultura de *Lactobacillus plantarum*, apresentou curva com queda contínua e a partir do 14º dia passou a ter um desempenho melhor que os demais tratamentos, atingindo a contagem de *L. monocytogenes* mais baixa

que os tratamentos A2 e C2 no 21º dia de processamento, estabilizando-se a partir de então. O tratamento com *L. plantarum* teve o melhor desempenho global, pois iniciou com a maior população e atingiu o índice de sobrevivência mais baixo, quando comparado aos tratamentos A2 e C2, no final do processo.

O tratamento C2 teve comportamento semelhante aos tratamentos A2 e B2, e apresentou a diferença de 3,3 log₁₀ na sobrevivência de *L. monocytogenes*, entre o início e final do processo.

Muitos trabalhos têm avaliado a eficiência do processo de fabricação de salames no controle de *L. monocytogenes* e o resultado destes estudos têm variado consideravelmente (8; 7; 17; 18; 25; 29; 31). Estas variações oscilam entre a efetividade do processo na redução das populações e o aumento das mesmas. Atribuiu-se a essas variações tanto os parâmetros utilizados em cada estudo (17), como às características das cepas utilizadas em cada experimento (29)

Ao longo do processo de fabricação somam-se obstáculos, que sinergicamente, tornam o ambiente inóspito aos patógenos (16). Na fase de fermentação apenas a queda do pH representa um obstáculo importante ao crescimento e sobrevivência de *Listeriae* (29), embora o crescimento destas populações, nesta etapa, já tenham sido registrado por Glass e Doyle (11) em estudos onde não foram utilizadas culturas de bactérias ácido-lácticas, e por Chikthimmah et al. (7) na elaboração de *Lebanon Bologna*. Na fase de secagem e maturação, soma-se ao baixo pH, a diminuição da Aw e aumento da concentração de sais (29). Quando presentes culturas iniciadoras de bactérias ácido-lácticas, produtoras ou não de bacteriocinas, mais um obstáculo é acrescentado (6).

Os principais fatores atribuídos à sobrevivência de *L. monocytogenes* ao longo do processo e no produto final que têm sido destacados são sua habilidade em desenvolver resistência à acidez do meio (22; 3) e segundo alguns estudos, o tamanho da população inicial tem efeito sobre a sobrevivência da população frente a estas condições adversas (13; 18; 14; 17). Esta característica é mais comum a algumas cepas isoladas em alimentos fermentados ou no ambiente onde estes são processados, e está relacionada à sua patogenicidade (35). Quando se comparou os tratamentos A1 e A2 (que representam condições semelhantes), o tratamento A1, com uma população de *L. monocytogenes* menor apresentou um leve crescimento inicial, enquanto o tratamento A2, com população inicial maior de *L. monocytogenes* teve queda contínua até o final do processo, isto pode ser

devido à origem das cepas presentes em cada tratamento.

Concluindo, verificou-se que sob as condições de fermentação e maturação empregadas neste estudo, a diminuição da contaminação por *L. monocytogenes* em salames tipo Italiano é mais lenta do que nos trabalhos desenvolvidos até então na Europa (8; 18; 31) que obtiveram uma diminuição expressiva já no início do processo, provavelmente porque a diminuição do pH e atividade água naqueles processos serem mais drásticos. Quando ocorre aumento da população de *L. monocytogenes* na fase inicial, esta é mais intensa do que o observado em outros trabalhos (6).

Embora não tenham sido verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os três tratamentos artificialmente contaminados, no tratamento B2 (inoculado com *L. plantarum*) ocorreu um ligeiro distanciamento em relação a curva do tratamento padrão (A2) e a curva do tratamento C2 (com adição de lactato de sódio), que foi similar a curva padrão. Desta forma a utilização de culturas bioprotetoras como *Lactobacillus plantarum* são recomendáveis na produção comercial de salame tipo Italiano e o uso de lactato de sódio, embora apresentando resultado satisfatório, deve ser melhor avaliado, principalmente na possibilidade de uso concomitante com outras substâncias inibidoras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BACUS, J. (1986). *Utilization of Microorganisms in Meat Processing*. Research Studies Press LTD, Letchworth. 170p.
2. BOLTON, L.F.; FRANK, J.F. (1999). Simple method to observe the adaptive response of *Listeria monocytogenes* in food. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 350-353.
3. BONNET, M.; MONTVILLE, T.J. (2005). Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 237-242.
4. BRASIL (1999). Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. *Métodos Analíticos Físico-químicos para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes – Sal e Salmoura*. Instrução Normativa N° 20, de 21 de julho de 1999. Brasília.

5. BRASIL (2000). Ministério da Agricultura e do Abastecimento. *Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Copa, de Jerked Beef, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salame tipo Alemão, de Salame tipo Calabrês, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo Hamburguês, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano, de Lingüiça Colonial e Pepperoni*. Instrução Normativa N° 22, de 31 de julho de 2000. Brasília.
6. CAMPANI, M.; PEDRAZZONI, I.; BARBUTI, S.; BALDINI, P. (1993). Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic-acid bacteria starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 20 (3), 169-175.
7. CHIKTHIMMAH, N.; GUYER, R.B.; KNABEL, S.J. (2001) Validation of a 5-Log₁₀ Reduction of *Listeria monocytogenes* following Simulated Commercial Processing of Lebanon Bologna in a model System. *J. Food Protect.* 64, 873-876.
8. ENCINAS, J.P.; SANZ, J.J.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L. OTERO, A. (1999). Behaviour of *Listeria* spp. in naturally contaminated chorizo (Spanish fermented sausage). *Int. J. Food Microbiol.* 46, 167-171.
9. FARBER, J.M; PETERKIN, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Micróbíol. Rev.* 55, 476-511.
10. GARCIA, F.T.; GAGLEAZZI, U.A.; SOBRAL, P.J.A. (2000) Variação das propriedades físicas e químicas do salame tipo Italiano durante secagem e fermentação. *Braz. J. Food Technol.* 3, 151-158.
11. GLASS, K.A.; DOYLE, M.P. (1989). Fate and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beaker sausage and pepperoni. *J. Food Protect.* 52, 226-231.
12. INCZE, K. (1998) Dry Fermented Sausages. *Meat Sci.* 49 (1), 169-177.
13. JOHNSON, J.L.; DOYLE, M.P.; CASSENS, R.G.; SHOENI, J.L. (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and hard salami. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 497-501.
14. KOUTSOUMANIS, K.P.; SOFOS, J.N. (2005). Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and a_w limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 83-91.

15. KRISPIEN, K.; RÖDEL, W.; LEISTNER, L. (1979). Vorschlag zur Berechnung der Wasseraktivität (a_w – Wert) von Fleischerzeugnissen aus den Gehalten von Wasser und Kochsalz. *Fleischwirtsch* 59 (8), 1173-1177.
16. LEISTNER, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 181-186.
17. NIGHTINGALE, K.K.; THIPPAREDDI, H.; PHEBUS, R.K.; MARSDEN, J.L.; NUTSCH, A.L. (2006). Validation of Traditional Italian-Style Salami Manufacturing Process for Control of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 69 (4), 794-800.
18. NISSEN, H.; HOLCK, A. (1998). Survival of *Escherichia coli* o157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella kentucky* in Norwegian fermented, dry sausage. *Food Microbiol.* 15, 273-279.
19. ORDÓÑEZ-PEREDA, J.A.; RODRIGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.; MINGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALES, L.H.; CORTECERO, M.D.S. (2005). *Tecnologia de Alimentos - Alimentos de Origem Animal*. Vol. 2. Editora Artmed, São Paulo, 279p.
20. PECCIO, A.; AUTIO, T.; KORKEALA, H.; ROSMINI, R.; TREVISANI, M. (2003). *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 234-238.
21. PHAN-THANH, L.; MAHOUIN, F.; ALIGÉ, S. (2000). Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 121-126.
22. PIDCOCK, K.; HEARD, G.M.; HENRIKSON, A. (2002). Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 75-81.
23. POND, T.J.; WOOD, D.S.; MUMIN, I.M.; BARBUT, S.; GRIFFITHS, M.W. (2001). Modeling the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in uncooked, semidry, fermented sausage. *J. Food Protect.* 64 (6), 759-766.
24. RODRIGUES, R.A.; TERRA, N.N.; FRIES, L.L.M. (2000). Lactato de Sódio, um conservante natural no processamento de lingüiça frescal. *Higiene Alimentar* 14 (75), 56-61.

25. SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; VLASSI, M.; PAPPAS, A. (1998). Stability and safety of traditional Greek salami – a microbiological ecology study. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 69-82.
26. SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. (1997). *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. Editora Livraria Varela, São Paulo, 295p.
27. SILVA, W.P.; LIMA, A.S.; GANDRA, E.A.; ARAÚJO, M.R.; MACEDO, M.R.; DUVAL, E.H. (2004). *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, 34 (3), 911-916.
28. TERRA, A.B.M.; FRIES, L.L.M.; TERRA, N.N. (2004). *Particularidades na fabricação de salame*. Livraria Varela, São Paulo, 152p.
29. THÉVENOT, D.; DELIGNETTE-MULLER, M.L.; CHRISTIEANS, S.; VERNZOY-ROZAND, C. (2005a). Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 189-200.
30. THÉVENOT, D.; DELIGNETTE-MULLER, M.L.; CHRISTIEANS, S.; VERNZOY-ROZAND, C. (2005b). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 85-94.
31. TYÖPÖNEN, S.; MARKKULA, A.; PETÄJÄ, E.; SUIHKO, M.-L.; MATTILA-SANDHOLM, T. (2003). Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. *Food Control*, 14, 181-185.
32. U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. (2003) Bacteriological Analytical Manual - Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. U.S. Department of Health and Human services. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>
33. VARABIOFF, Y. (1992). Incidence of *Listeria* in small goods. *Lett. Appl. Microbiol.* 14, 167-169.
34. VIEIRA, E.N.R.; MENDONÇA, R.C.S. (2005). Leveduras em embutidos fermentados: opção tecnológica. *Revista Nacional da Carne*, ed. 340. <http://www.dipemar.com.br>
35. VIALETTE, M.; PINON, A.; CHASSEIGNAUX, E.; LANGE, M. (2003). Growth kinetics of clinical and seafood *Listeria monocytogenes* isolates in acid and osmotic environment. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 121-131.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos às Empresas Perdigão por fornecerem subsídios para a elaboração deste estudo, a Danisco do Brasil pela doação da cultura de *Lactobacillus plantarum* e a João Degenhardt e Eduardo Degenhardt pelas observações técnicas e auxílio na elaboração dos salames.

CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A capacidade de *Listeria monocytogenes* suportar condições ácidas é uma característica que deve ser considerada na produção de alimentos, não só por sua sobrevivência nos alimentos bem como no ambiente de produção.

Os processos de fabricação e sanitização das instalações expõem a bactéria ao stress ácido podendo desencadear o mecanismo de adaptação aumentando sua resistência e consequentemente sua virulência.

Estudos já desenvolvidos indicam que, as características das cepas e dos alimentos parecem estar diretamente relacionadas a capacidade de resposta ao stress ácido.

Estudos futuros correlacionando diferentes cepas (obtidas de fontes variadas) frente às características físico-químicas de diferentes matrizes com poderão fornecer subsídios para elaboração de estratégias para produção de alimentos mais seguros.