UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Atividade de compostos antimicrobianos para aplicação em produtos cárneos processados prontos para consumo visando o controle de *Listeria monocytogenes*

Rubia de Souza Olivo

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

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

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Atividade de compostos antimicrobianos para aplicação em produtos cárneos processados prontos para consumo visando o controle de *Listeria monocytogenes*

Rubia de Souza Olivo

Versão original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

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

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Olivo, Rubia de Souza
Q49a Atividade de compostos antimicrobianos para aplicação em produtos cárneos processados prontos para consumo visando controle de *Listeria monocytogenes* / Rubia de Souza Olivo. -- São Paulo, 2018.
76p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Franco, Bernadette D.G.M.

1. Alimentos : Controle de qualidade 2. Bacteriocinas : microbiologia de alimentos I. T. II. Franco, Bernadette D.G.M., orientador.

664.07 CDD

Rubia de Souza Olivo

Atividade de compostos antimicrobianos para aplicação em produtos cárneos processados prontos para consumo visando o controle de *Listeria monocytogenes*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.
orientador/presidente

_____
1o. examinador

_____
2o. examinador

_____
3o. examinador

_____
4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Rubison Olivo, por sempre apoiar minhas decisões. Você é a minha maior inspiração, profissional e de vida.

À minha mãe, Maria Zélia de Souza, por compreender minhas escolhas e por ter dedicado a maior parte da sua vida para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

Ao meu namorado, Gilberto Rodrigues, por estar sempre ao meu lado, pela paciência, ensinamentos e, principalmente, compreensão por todos os finais de semana que não pudemos estar juntos.

À Profa. Bernadette D.G.M. Franco, pela oportunidade, aprendizagem, paciência e por ter confiado a mim a realização deste trabalho sob sua supervisão.

À DuPont™ Nutrition & Health pela proposta de projeto, fornecimento de materiais e confiança.

Ao Centro de Tecnologia de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos (CTC-ITAL) pela produção das mortadelas utilizadas neste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela Bolsa de Mestrado concedida.

Às empresas Corbion Purac, Kemin Industries Inc. e Niacet Co. por fornecerem os aditivos químicos utilizados nos testes *in vitro* deste trabalho.

À Loredana D'Ovidio, Thamiris Silva, Ana Paula Di Foggi, Ana Clara Candelaria e Danielle Faria por toda disposição, ajuda, paciência e companheirismo. Sem vocês, o desenvolvimento deste trabalho teria sido muito mais difícil.

Aos melhores presentes que a microbiologia me deu: Thamiris Silva, Sarah Ferraz e Ximena Valência. Obrigada pela amizade e por tornarem São Paulo menos solitária.

À minha irmã de alma, Janaina Lopes, pelo companheirismo e por sempre me fazer acreditar no quanto sou capaz.

Aos Professores Mariza Landgraf e Uelinton Pinto por toda a contribuição, ensinamentos e valiosas sugestões.

Ao Svetoslav Todorov, por compartilhar seu conhecimento e estar sempre disposto a ajudar.

À todos os colegas de laboratório que me acompanharam nesses anos, pelos momentos de alegria que tivemos juntos, em especial à Dani Maffei, Aline, Daniel, Vanessa e Débora, por serem tão especiais. Levo vocês no coração.

À Katia e Lúcia pela amizade, paciência e auxílio no laboratório.

À Profa. Cynthia Kunigk pela disposição, sugestões e auxílio na parte de estatística desta dissertação.

Aos Professores Jonas Gruber e Neuza Hassimoto pelo auxílio com a emulsão do extrato de alecrim.

À Maria Crystina Igarashi pela colaboração no início deste trabalho.

Às Profas. Maria Ligia Coutinho e Ligia Bicudo pela oportunidade de realizar o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) e despertar em mim a vontade de seguir a docência.

Aos meus queridos clientes de brigadeiro dos blocos 13A e 14, que desde o início acreditaram em minhas ideias e me ajudaram a crescer.

Aos funcionários da FCF/USP pela atitude sempre colaborativa.

RESUMO

OLIVO, R.S. **Atividade de compostos antimicrobianos para aplicação em produtos cárneos processados prontos para consumo visando controle de *Listeria monocytogenes*.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, 2018.

Listeria monocytogenes é o microrganismo patogênico de maior relevância em carnes processadas prontas para consumo. A presença frequente de *L. monocytogenes* no ambiente pode levar a uma contaminação dos produtos após o processamento industrial e como esses produtos não passam por tratamento bactericida antes de serem consumidos, a saúde do consumidor pode estar em risco. Para inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* nos produtos cárneos durante o armazenamento em refrigeração após o processamento, os fabricantes podem utilizar diversos aditivos antimicrobianos na formulação destes produtos. Este estudo objetivou avaliar a atividade antimicrobiana de aditivos tradicionalmente empregados em produtos cárneos processados, e de quatro novos *blends* preparados à base de nisina (Nisaplin®) contra cepas de *L. monocytogenes*, fazendo-se a avaliação *in vitro* e *in situ*, em mortadelas experimentalmente contaminadas, formuladas com os compostos estudados, armazenadas à vácuo e em refrigeração (8 °C) por 70 dias. Os compostos extrato de alecrim, diacetato de sódio e Nisaplin®, quando testados *in vitro*, apresentaram maior eficiência na inibição das cepas de *L. monocytogenes* que lactato de sódio e vinagre tamponado. Quando testados *in vitro,* os produtos comerciais BioVia® CL600 e NovaGARD® LM100 e os quatro *blends* utilizados no preparo das mortadelas foram igualmente efetivos na inibição de *L. monocytogenes*. De acordo com os resultados dos testes *in situ*, o melhor controle de *L. monocytogenes* em mortadelas durante 70 dias a 8 °C ocorreu nos produtos preparados com o *blend* contendo extrato de alecrim, diacetato de sódio, vinagre tamponado e Nisaplin®. O *blend* contendo extrato de alecrim, lactato de sódio e Nisaplin®, foi o menos efetivo entre os *blends* testados.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes,* aditivos antimicrobianos, mortadela

ABSTRACT

OLIVO, R.S. **Activity of antimicrobial compounds for application in ready-to-eat meat products for the control of *Listeria monocytogenes***. Dissertation (Master). Graduate Program in Food Science. Faculty of Pharmaceutical Sciences. University of Sao Paulo, SP, 2018.

Listeria monocytogenes is the most important microbial pathogen in ready-to-eat processed meat products. The frequent presence of *L. monocytogenes* in the environment can lead to product contamination after industrial processing and since these products do not have a bactericidal step before consumed, consumer health may be at risk. To inhibit the multiplication of *L. monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage, manufacturers may use various antimicrobial additives in the formulation of these products. This study aimed to evaluate the *in vitro* and *in situ* activity of additives traditionally used in processed meat products and four new blends based on nisin (Nisaplin®) against *L. monocytogenes*, in experimentally contaminated bolognas, formulated with the studied compounds and stored under vacuum and refrigerated (8 ° C) for 70 days. Rosemary extract, sodium diacetate and Nisaplin®, when tested *in vitro*, were more effective than sodium lactate and buffered vinegar for the inhibition of the *L. monocytogenes* strains. When tested *in vitro*, the commercial products BioVia® CL600 and NovaGARD® LM100 and the four *blends* used in bologna preparation were equally effective in inhibiting *L. monocytogenes*. According to the results of the *in situ* tests, the best control of *L. monocytogenes* in bolognas for 70 days at 8 °C occurred in the products prepared with the *blend* containing rosemary extract, sodium diacetate, buffered vinegar and Nisaplin®. The *blend* containing rosemary extract, sodium lactate and Nisaplin®, was the least effective among the tested blends.

Key-words: *Listeria monocytogenes,* antimicrobial additives, bologna

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados nos ensaios de PCR, de acordo com Camargo *et al.*, 2016 27

Tabela 2. Concentrações dos compostos testados.....31

Tabela 3. Concentrações dos compostos empregados na avaliação de sua atividade antimicrobiana.....31

Tabela 4. Composição das mortadelas M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7 35

Tabela 5. Propriedades* das mortadelas 36

Tabela 6. Efeito do Triton X-100 a 0,25% sobre a contagem (log UFC/mL) de *Listeria monocytogenes* 42

Tabela 7. Valores de CIM para lactato de sódio, diacetato de sódio, vinagre tamponado, extrato de alecrim e Nisaplin®, determinados para as cepas *L. monocytogenes* 500, 508, 595, ATCC 7644 e Scott A 49

Tabela 8. Valores de CIM dos produtos comerciais e *blends* utilizados nos lotes A e B de mortadela frente as cepas *L. monocytogenes* 500, 508 e 595 e o *pool* dessas cepas.....55

Tabela 9. Valores de CIM dos produtos comerciais e *blends* utilizados no lote C de mortadela frente as cepas *L. monocytogenes* 500, 508 e 595 e o *pool* dessas cepas 60

Tabela 10. Média das contagens (log UFC/g ± DP) de *L. monocytogenes* em três lotes de mortadela (formulações M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7) durante armazenamento a 8 °C por 70 dias.....62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da produção de mortadelas 34

Figura 2. Obtenção das fatias de mortadela.....37

Figura 3. Peças do fatiador em banho com detergente alcalino 38

Figura 4. Aplicação de luz ultravioleta nas peças do fatiador.....38

Figura 5. Genes de virulência nas cepas de *L. monocytogenes* testadas.....41

Figura 6. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 500 frente ao lactato de sódio (A), diacetato de sódio (B), vinagre tamponado (C), extrato de alecrim (D) e Nisaplin® (E).....44

Figura 7. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 508 frente ao lactato de sódio (A), diacetato de sódio (B), vinagre tamponado (C), extrato de alecrim (D) e Nisaplin® (E).....45

Figura 8. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 595 frente ao lactato de sódio (A), diacetato de sódio (B), vinagre tamponado (C), extrato de alecrim (D) e Nisaplin® (E).....46

Figura 9. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* ATCC 7644 frente ao lactato de sódio (A), diacetato de sódio (B), vinagre tamponado (C), extrato de alecrim (D) e Nisaplin® (E).....47

Figura 10. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* Scott A frente ao lactato de sódio (A), diacetato de sódio (B), vinagre tamponado (C), extrato de alecrim (D) e Nisaplin® (E).....48

Figura 11. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 500 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados nos lotes A e B de mortadela 51

Figura 12. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 508 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados nos lotes A e B de mortadela 52

Figura 13. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 595 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados nos lotes A e B de mortadela 53

Figura 14. Densidade óptica (620 nm) do *pool* de culturas de *L. monocytogenes* 500, 508 e 595 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados nos lotes A e B de mortadela 54

Figura 15. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 500 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados no lote C de mortadela 56

Figura 16. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 508 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados no lote C de mortadela 57

Figura 17. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 595 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados no lote C de mortadela 58

Figura 18. Densidade óptica (620 nm) do *pool* de culturas de *L. monocytogenes* 500, 508 e 595 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados no lote C de mortadela 59

Figura 19. Média das contagens (log UFC/g ± DP) de *L. monocytogenes* nos três lotes de mortadela (formulações M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7) durante armazenamento a 8 °C por 70 dias.....61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
1.1. Listeria monocytogenes em produtos cárneos processados 15
1.2. Sais e ácidos orgânicos 16
1.2.1. *Lactato de sódio* 16
1.2.2. *Diacetato de sódio* 17
1.2.3. *Ácido acético e seus derivados* 18
1.3. Extrato de alecrim 19
1.4. *Nisina* 20
1.5. Desenvolvimento de novos antimicrobianos 21
2. OBJETIVOS GERAIS 22
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 22
3. MATERIAIS E MÉTODOS 23
3.1. *Cepas de Listeria monocytogenes* 23
3.1.1. *Fermentação de carboidratos* 23
3.1.2. *Produção de β-hemólise* 24
3.1.3. *Teste de catalase* 24
3.1.4. *Teste de motilidade* 24
3.1.5. Sequenciamento 16S rRNA 24
3.1.6. *Pesquisa de genes de virulência* 25
3.1.7. *Preparo das culturas de L. monocytogenes para os testes in vitro e in situ*..... 26
3.2. *Compostos testados* 28
3.2.1. *Compostos empregados nos testes in vitro* 28
3.2.2. *Compostos empregados nos testes in situ* 29
3.3. *Determinação da atividade antimicrobiana in vitro* 30
3.4. *Determinação de atividade antimicrobiana in situ (mortadela)* 30
3.4.1. *Controle da atividade antimicrobiana dos produtos comerciais e blends utilizados nos testes in situ* 30
3.4.2. *Produção das mortadelas* 32
3.4.3. *Preparo das amostras de mortadela para os testes* 37
3.4.4. *Contaminação experimental das fatias de mortadela* 39

3.4.5. *Contagem de L. monocytogenes nas fatias de m*ortadela.....39
3.5. *Análise estatística* 40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 40
4.1. *Cepas de Listeria monocytogenes* 40
4.2. *Determinação da atividade antimicrobiana in vitro* 42
4.3. *Determinação da atividade antimicrobiana in situ (mortadela)* 50
4.3.1. *Controle da atividade antimicrobiana dos produtos comerciais e blends utilizados nos testes in situ* 50
4.3.2. *Atividade antimicrobiana in situ dos produtos comerciais e blends* 60
5. CONCLUSÃO 68
6. REFERÊNCIAS 69

1. INTRODUÇÃO

Os produtos cárneos processados estão sujeitos à contaminação microbiana em todas as fases do processamento tecnológico quando as Boas Práticas de Fabricação são negligenciadas. Dependendo das características intrínsecas desses produtos, os microrganismos patogênicos e causadores de deterioração presentes podem multiplicar-se, comprometendo a segurança e alterando as caraterísticas de qualidade, como cor, odor, sabor, textura e aparência (FERREIRA *et al.*, 2014; IULIETTO *et al*., 2015; NIKMARAM *et al.*, 2018).

O microrganismo patogênico de maior relevância em produtos cárneos processados é *Listeria monocytogenes,* que causa a listeriose, uma das enfermidades transmitidas por alimentos que apresentam maior taxa de hospitalização e mortalidade. A listeriose afeta principalmente pessoas com o sistema imunológico comprometido, recém-nascidos, idosos e mulheres grávidas, podendo causar meningites, encefalites, aborto e outras patologias (SCALLAN *et al.*, 2011; USDA, 2015, BUCHANAN *et al.*, 2017).

L. monocytogenes é um bacilo gram-positivo, não formador de esporo, anaeróbio facultativo, móvel devido à presença de flagelos e apresenta reação positiva para catalase e negativa para oxidase. Multiplica-se em temperaturas de 0 a 45 °C, pH entre 4,1 e 9,6 e Aa acima de 0,92 (THAKUR, ASRANI & PATIAL, 2018). *L monocytogenes* está amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado no solo, silagem, fezes de animais e humanos e plantas processadoras de alimentos. Os alimentos são considerados o principal veículo deste patógeno para humanos. Contribuem para este fato a capacidade de formar biofilmes em superfícies amorfas, sobreviver e se multiplicar em temperaturas de refrigeração e em atmosferas modificadas e resistir ao congelamento e à presença de altos níveis de nitrato de sódio (120 mg/kg) e cloreto de sódio (10-20%) e também à ação de sanitizantes (FERREIRA *et al.*, 2014; BUCHANAN *et al.*, 2017; THAKUR, ASRANI & PATIAL, 2018).

Por ser facilmente encontrada em quase todos os tipos de superfícies de contato com os alimentos, *L. monocytogenes* pode se transferir para um alimento não contaminado, através da contaminação cruzada, oferecendo risco de enfermidades aos consumidores (GIAOURIS *et al.*, 2014; MELERO *et al.*, 2019).

1.1. Listeria monocytogenes em produtos cárneos processados

Segundo o artigo 412 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), produtos cárneos processados são definidos como produtos elaborados com carnes ou outros tecidos animais comestíveis, curados ou não, defumados e dessecados ou não, tendo como envoltório natural tripas, bexigas ou outras membranas animais ou envoltório artificial apropriado (MAPA, 2013).

Uma das fontes de contaminação desses produtos por *L. monocytogenes* é a matéria-prima empregada. Nos produtos processados curados, o longo processo de maturação favorece a multiplicação desse microrganismo, enquanto naqueles submetidos a tratamento térmico insuficiente, a multiplicação de *L. monocytogenes* é favorecida pela ausência de microrganismos competidores (GOMBAS *et al.*, 2003; ZILELIDOU & SKANDAMIS, 2018).

No caso de produtos cárneos processados fatiados, como ocorre com os embutidos, o fatiamento pode levar à contaminação cruzada por *L. monocytogenes*. Sauders *et al.* (2009) observaram a presença de *L. monocytogenes* em 60% dos ambientes de fatiamento de produtos cárneos analisados. A vida-de-prateleira longa, entre 30 a 60 dias sob refrigeração, pode resultar em intensa multiplicação durante o armazenamento, pois a embalagem a vácuo ou em atmosfera modificada é insuficiente para controlar a multiplicação de *L. monocytogenes* (GRAU & VANDERLINDE, 1992; CHAITIEMWONG *et al*., 2014; BUCHANAN *et al*., *2017*; JORDAN & MCAULIFFE, 2018). Estudos de análise de risco mostraram que 70% dos casos de morte por listeriose podem ser associados ao consumo de produtos cárneos prontos para consumo fatiados no varejo (ENDRIKAT *et al.*, 2010).

A presença de *L. monocytogenes* em produtos cárneos processados prontos para consumo é uma preocupação para a saúde pública, já que esse tipo de alimento não necessita de cozimento anteriormente ao seu consumo. A indústria de alimentos busca constantemente novas soluções tecnológicas para inibir ou retardar a multiplicação de microrganismos indesejáveis como *L. monocytogenes*, objetivando minimizar perdas econômicas e aumentar a segurança dos produtos que fabrica, evidenciando a importância dos aditivos antimicrobianos de aplicação em alimentos (JORDAN & MCAULIFFE, 2018).

Os principais compostos de ação antimicrobiana empregados em produtos cárneos são:

1.2. Sais e ácidos orgânicos

Sais e ácidos orgânicos são capazes de controlar a presença de bactérias patogênicas e deteriorantes, e são comumente utilizados em produtos cárneos prontos para consumo, atuando na redução da atividade de água ou pH, o que contribui para o controle da multiplicação microbiana. Também podem agir diretamente na membrana citoplasmática bacteriana, afetando o transporte de nutrientes e o metabolismo energético, além de acidificar o meio intracelular. Essas alterações causam diminuição da atividade metabólica e, consequentemente, da velocidade de multiplicação microbiana. Quando combinados com outros sais, seu efeito pode ser potencializado, mesmo quando utilizados em baixas concentrações (BUCHANAN, GOLDEN & WHITING, 1993; SHELEF, 1994; LUCERA *et al.*, 2012; ALAHAKOON *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.,* 2015; LIN *et al.*, 2018).

1.2.1. *Lactato de sódio*

O lactato de sódio é um sal orgânico reconhecido como GRAS (Generally Recognized as Safe, USFDA, 21 CFR 184.1768, 2018), empregado em embutidos cárneos como emulsificante, intensificador de sabor, umectante, antioxidante e regulador de acidez (SHELEF, 1994).

Nos Estados Unidos, o USFDA (2000) permite o uso de até 4,8% de lactato de sódio como antimicrobiano no peso final do produto. Esse valor foi questionado por Perumalla *et al.* (2012), pois esses autores consideram que concentrações acima de 3% podem afetar as propriedades organolépticas dos produtos. No Brasil, não há um limite especificado, mas a Instrução Normativa Federal nº 51, de 29 de Dezembro de 2006, determina que o lactato de sódio pode ser utilizado em quantidades suficientes para se obter o efeito tecnológico desejado, desde que as características genuínas do alimento não sejam alteradas (BRASIL, 2006).

Vários estudos confirmam o efeito bacteriostático do lactato de sódio em produtos cárneos prontos para consumo. Bingöl & Bostan (2007) observaram que o lactato de sódio utilizado como alternativa para o nitrito pode diminuir o crescimento de microrganismos, estendendo a vida de prateleira de salsichas embaladas á vácuo (4 °C) para 45 e 60 dias, quando usado nas concentrações de 0,6% e 1,2%, respectivamente. A concentração de 1,8% foi capaz de estender esse tempo para mais de 60 dias. Estudos realizados no Brasil por Silva *et al.* (2014) mostraram que

lactato de sódio (3%) e nisina (0,5%), isolados e em combinação, aumentaram o prazo de validade de linguiça toscana, observando que a associação desses dois aditivos evidenciou melhores resultados do que o uso de cada aditivo separadamente. Morey *et al.* (2014) mostraram que lactato de sódio (2%) combinado com diacetato de sódio (0,25%), apresentou efeito listeriostático por 4 semanas em salsichas do tipo frankfurter embaladas a vácuo e mantidas a 4 °C. Em contrapartida, estudos recentes (LIU *et al.,* 2017; SUO *et al.,* 2018) contestaram a atividade do lactato de sódio sobre *L. monocytogenes*.

1.2.2. *Diacetato de sódio*

O diacetato de sódio é também classificado como GRAS (USFDA, 21 CFR 184.1754, 2018). Estudos recentes mostram que, em baixas concentrações, esse composto não causa efeitos citotóxicos em células humanas, sendo considerado como seguro para aplicação em alimentos (MOHAMMADZADEH-AGHDASH *et al*., 2018).

Nos Estados Unidos, é permitida a utilização na concentração de 0,25% por peso total do produto, com a função de controlar a acidez e proporcionar sabor (USFDA, 2000). Concentrações mais elevadas podem alterar as características organolépticas dos produtos, considerando que esse composto possui sabor e odor de vinagre. Segundo Perumalla *et al.* (2012), o nível máximo de uso para não influenciar no sabor é de 0,1% a 0,15%.

O diacetato de sódio tem grande relevância para a indústria, principalmente para o controle de patógenos em produtos cárneos prontos para consumo (MBANDI & SHELEF, 2001; HWAN & TAMPLIN, 2007). Bedie *et al.* (2001) estudaram a ação do diacetato de sódio em salsichas frankfurter embaladas a vácuo, observando efeito bacteriostático sobre *L. monocytogenes* durante 50 dias a 4 °C na concentração de 0,25%. Na concentração de 0,5%, observou-se o efeito por 120 dias, mas essa concentração ultrapassa o nível permitido pela legislação americana (USFDA, 2000).

O diacetato de sódio é capaz de estender a fase lag de *L. monocytogenes* e, quando associado a outros sais, como lactatos, esse fenômeno é potencializado (HWAN & TAMPLIN, 2007). Trabalhando com carne crua moída, Mbandi & Shelef (2001) mostraram que o diacetato de sódio a 0,1% e 0,2% apresentou efeito

inibitório na multiplicação de *L. monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*, durante 25 dias de armazenamento a 10 °C. Esse efeito foi ainda maior quando o diacetato de sódio (0,2%) foi combinado com lactato de sódio (2,5%), mostrando atividade sinérgica. Barmpalia *et al.* (2005) observaram que a combinação de 0,25% de diacetato de sódio com 1,8% de lactato de sódio foi capaz de inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* em mortadelas mantidas a 4 e 10 °C. Empregando testes preditivos, Pradham *et al.* (2009) mostraram que esses antimicrobianos podem prevenir casos de listeriose decorrentes da ingestão de produtos cárneos prontos para consumo contaminados.

O uso do diacetato de sódio em produtos cárneos ainda não é permitido no Brasil. Através da Resolução nº 38/01, o Mercosul considera incorporá-lo na "Lista Geral Harmonizada de Aditivos MERCOSUL" (Res. GMC N° 19/93) e atribuir-lhe a função de conservante, completando a "Lista de Aditivos Alimentares com suas Classes Funcionais" (Res. GMC N° 101/94). Também há um documento oficial da ANVISA dando abertura para discussão pública da eventual permissão do uso do diacetato de sódio em alimentos no Brasil (BRASIL, 2000).

1.2.3. *Ácido acético e seus derivados*

O ácido acético, classificado como GRAS (USFDA, 21 CFR 184.1005, 2018), é um dos compostos mais antigos utilizados no controle da multiplicação de microrganismos, principalmente pela sua eficácia e baixo custo (CONNER & ALLGEIER, 1976; LUCERA *et al.*, 2012). Nos Estados Unidos, permite-se seu uso em produtos a 0,6% do peso final do alimento, principalmente como regulador de acidez, agente saborizante e solvente (USFDA, 2018).

O vinagre tamponado é utilizado pela indústria de carnes em produtos frescos ou processados, principalmente pelo seu efeito listeriostático (STEZLENI, PONRAJAN & HARRISON, 2013; PORTO-FETT *et al.*, 2018). Há um limite de uso, pois concentrações a 2% ou 2,5% podem causar alterações nas características sensoriais desses produtos (PONRAJAN *et al.*, 2012; STEZLENI, PONRAJAN & HARRISON, 2013).

Nos estudos realizados por Porto-Fett *et al.* (2014), peças de peito de peru, não curado, contaminadas com *L. monocytogenes* e tratadas com vinagre tamponado a 2%, 2,5% e 3% e levadas ao fatiamento, apresentaram redução na

contagem do patógeno durante o armazenamento das fatias em refrigeração. Também Desai *et al.* (2014) observaram aumento da vida de prateleira de coxas de frango borrifadas com vinagre tamponado a 1% e posteriormente embaladas com CO_2 e armazenadas em refrigeração. McDonnell, Glass & Sindelar (2013), ao comparar o crescimento de *L. monocytogenes* em presunto formulado com 2,5% de vinagre tamponado e com 2,8% de uma mistura de lactato de sódio e diacetato de sódio, observaram que o vinagre tamponado teve melhor efeito que a mistura de sais no retardamento do crescimento de *L. monocytogenes* durante o armazenamento a 4 °C sob vácuo.

1.3. Extrato de alecrim

Os antimicrobianos extraídos de plantas vêm ganhando destaque na indústria de alimentos devido à crescente preocupação dos consumidores em adquirirem alimentos mais próximos do natural. Vários estudos mostram que esses extratos são efetivos no controle do desenvolvimento microbiano em carnes, podendo substituir os aditivos sintéticos (LUCERA *et al.*, 2012; NIKMARAM *et al.*, 2018).

Os extratos naturais são considerados seguros (GRAS) e quando adicionados em produtos cárneos prontos para consumo, podem exercer atividade antioxidante, além da ação antimicrobiana, mesmo em baixas concentrações (0,001-0,01%). Esses compostos se mantêm estáveis durante as etapas de processamento e armazenamento de produtos cárneos (LUCERA *et al.*, 2012; LORENZO *et al.*, 2018; NIKMARAM *et al.*, 2018), mas seu uso é discutível pois podem alterar o odor e sabor dos alimentos, embora Ghabraie *et al.* (2016) tenham reportado que 0,05% de diversos compostos naturais foram capazes de controlar a multiplicação de microrganismos patogênicos em carne moída sem alterar as características sensoriais.

O extrato de alecrim é um bom exemplo de extrato natural de aplicação em alimentos. O alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) pertence à família *Lamiaceae* e o extrato, obtido principalmente das folhas, é rico em compostos fenólicos. Segundo Mena *et al.* (2016), os extratos vegetais contém diterpenos, como ácido carnósico e carnosol, ácidos fenólicos (ácido rosmarinico) e flavonoides, que têm relação com a função antioxidante e antimicrobiana, podendo melhorar a qualidade e aumentar a vida de prateleira dos alimentos. O extrato de alecrim é capaz de controlar a

deterioração de produtos cárneos prontos para consumo, ocasionada pela formação de radicais livres a partir da oxidação lipídica, que pode ocasionar alterações de cor e sabor nesses produtos durante o processamento ou armazenamento em baixas temperaturas (DOOLAEGE *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2016).

O efeito antimicrobiano do extrato de alecrim é maior em bactérias gram-positivas, como *L. monocytogenes* (LUCERA *et al.*, 2012; NIKMARAM *et al.*, 2018). Considerando sua característica hidrofóbica, o extrato de alecrim altera a permeabilidade da membrana celular, causando o extravasamento de íons e enzimas citoplasmáticas necessárias para o metabolismo (PESAVENTO *et al.*, 2015; SWAMY, AKHTAR & SINNIAH, 2016).

1.4. *Nisina*

A nisina é uma bacteriocina produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis,* capaz de inibir bactérias gram-positivas, como *L. monocytogenes.* Trata-se da bacteriocina mais conhecida atualmente, utilizada como bioconservante em vários tipos de alimentos, incluindo os produtos cárneos processados. A nisina apresenta algumas vantagens tecnológicas como estabilidade em pH ácido, resistência às altas temperaturas empregadas no processamento térmico, manutenção da atividade durante a refrigeração dos produtos e potencial de incorporação à materiais de embalagem (REUNANEN & SARIS, 2004; SHIN *et al.*, 2017).

A nisina é comercializada como Nisaplin®, fazendo parte de vários antimicrobianos comerciais, como NovaGARD® NR100 e NovaGARD® LM100, produzidos e comercializados pela DuPont™ Nutrition and Health, EUA. NovaGARD® NR100 é uma mistura de nisina livre e extrato de alecrim, enquanto NovaGARD® LM100 é uma mistura de nisina encapsulada, nisina livre, extrato de alecrim e diacetato de sódio (DUPONT, 2018). Brasileiro *et al.* (2016) observaram que o produto NovaGARD® LM100, adicionado à massa de mortadelas, foi efetivo no controle da multiplicação de *L. monocytogenes* no produto final fatiado e embalado a vácuo, durante 30 dias de armazenamento a 8 °C.

Segundo o USFDA (2018), a nisina é reconhecida como GRAS. Seu uso em produtos cárneos está aprovado na Europa e nos Estados Unidos na quantidade de 25 mg/kg de produto (EFSA, 2017; CODEX ALIMENTARIUS, 2018). Na Nova

Zelândia, a quantidade permitida nestes produtos é 12,5 g/kg (FSANZ, 2007). No Brasil, a nisina pode ser utilizada apenas em determinados tipos de queijos na concentração máxima de 12,5 mg/kg (BRASIL, 1996). Segundo a EFSA (2017), estudos toxicológicos comprovam que o consumo diário de nisina em quantidades de 0,13 g/kg de peso corporal é seguro para o consumidor, podendo ser utilizada em todos os tipos de alimentos.

A nisina age através da adesão ao lipídeo II da parede celular bacteriana e o complexo nisina-lipídeo II penetra na membrana citoplasmática formando poros, acarretando extravasamento de componentes celulares imprescindíveis para a sobrevivência do microrganismo (BREUKINK *et al.,* 1999; WIEDEMAN *et al*., 2001). SCHI *et al.* (2013) observaram que a nisina pode inibir a expressão de alguns genes de virulência de *L. monocytogenes,* como *inl*, *hyl*A, *prf*A e *plc*A, diminuindo sua patogenicidade.

A eficácia da nisina aumenta quando combinada com outros aditivos, como extratos naturais e sais orgânicos, agindo sinergicamente na alteração da permeabilidade da membrana celular (ALAHAKOON *et al.*, 2015; SWAMY, AKHTAR & SINNIAH, 2016).

Além da nisina, outras bacteriocinas produzidas por bactérias láticas vêm sendo estudadas como agentes antimicrobianos de aplicação em alimentos (BISCOLA *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2015; BRASILEIRO *et al.*, 2016; KONDROTIENE *et al.*, 2018; CHIKINDAS *et al.*, 2018).

1.5. Desenvolvimento de novos antimicrobianos

Muitos casos de listeriose têm sido associados a produtos cárneos prontos para consumo, principalmente os fatiados e embalados no varejo, onde as Boas Práticas de Fabricação muitas vezes são negligenciadas, podendo acarretar em contaminação cruzada. A refrigeração e a embalagem á vácuo, aplicadas nestes produtos após o fatiamento, são insuficientes para controlar a multiplicação de *L. monocytogenes,* sendo necessário utilizar aditivos antimicrobianos para garantir segurança e a vida de prateleira desses produtos (HOLEY & PATEL, 2005; BUCHANAN *et al*., 2017). O USDA-FSIS (2015) estima que 96% dos casos de listeriose ocorridos pelo consumo de produtos prontos para consumo poderiam ter sido prevenidos se agentes antimicrobianos tivessem sido utilizados.

As opções de aditivos antimicrobianos para uso em produtos cárneos processados são limitadas, principalmente aquelas baseadas na combinação de nisina com outros compostos com atividade sobre *L. monocytogenes*, que é o contaminante de maior importância em produtos prontos para consumo. Há, portanto, um amplo e interessante campo de pesquisa a ser explorado, o que motivou o desenvolvimento deste projeto de pesquisa, de importante potencial de aplicação prática.

2. OBJETIVOS GERAIS

Este estudo objetivou avaliar a atividade antimicrobiana de aditivos tradicionalmente empregados em produtos cárneos processados (lactato de sódio, diacetato de sódio, vinagre tamponado, extrato de alecrim e nisina), isoladamente e em combinação com nisina (*blends*), contra cepas de *Listeria monocytogenes*, fazendo-se a avaliação *in vitro* e *in situ*, em mortadelas experimentalmente contaminadas, formuladas com os compostos estudados, fatiadas e armazenadas à vácuo e em refrigeração (8 °C) por 70 dias.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de aditivos tradicionais e nisina frente a três cepas de *L. monocytogenes* isoladas de produtos cárneos (500, 508 e 595), comparando-as com duas cepas referência (ATCC 7644 e Scott A).
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in situ* de aditivos tradicionais e de novos *blends* à base de nisina em mortadelas formuladas com os compostos estudados, fatiadas e experimentalmente contaminadas com um *pool* das cepas de *L. monocytogenes* isoladas de produtos cárneos, durante armazenamento à vácuo e em refrigeração (8 °C) por 70 dias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Cepas de Listeria monocytogenes*

O estudo foi desenvolvido com cinco cepas de *Listeria monocytogenes*, sendo três cepas isoladas de embutidos cárneos (cepas 500, 508 e 595) e duas cepas de referência (ATCC 7644 e Scott A). Tais cepas pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP e são mantidas a -80 ºC em caldo BHI (Oxoid, Reino Unido) acrescido de 20% (v/v) de glicerol (Labsynth, Brasil).

Para confirmação da espécie, as cepas de *L. monocytogenes* selecionadas foram submetidas a testes bioquímicos, de acordo com SILVA *et al*. (2007a) e a testes moleculares de sequenciamento 16S rRNA, de acordo com Felske *et al*. (1997). A patogenicidade das cepas foi confirmada através da pesquisa dos genes de virulência *lux*S, *plc*A*, inl*A*, inl*B*, inl*C*, inl*J*, hly*A*, act*A e *iap,* de acordo com Camargo *et al.* (2016), empregando-se as cepas de *L. monocytogenes* 104, 711 e 637 como controles positivos.

Para os testes bioquímicos, as cepas foram cultivadas em 10 mL de caldo tripticase de soja acrescido de 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE, Oxoid, Reino Unido), por 24 h a 37 °C e estriadas em ágar Oxford (Oxoid, Reino Unido). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e 3 colônias isoladas foram selecionadas e semeadas em ágar tripticase de soja acrescido de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE, Oxoid, Reino Unido), para purificação. Após incubação por 24 h a 37 °C empregou-se luz oblíqua para observar a coloração das colônias nas placas de TSA-YE. Colônias com coloração azulada e iridescente, típicas de *Listeria* spp., foram selecionadas para os testes de fermentação de carboidratos, β-hemólise, catalase e motilidade.

3.1.1. *Fermentação de carboidratos*

As culturas foram estriadas em placas de petri contendo ágar purpura de bromocresol (Oxoid, Reino Unido) acrescido de 0,5% de dextrose, manitol, xilose ou ramnose (Labsynth, Brasil), incubadas por 24 h a 37 °C, e examinadas quanto à alteração da cor dos meios de cultura, de púrpura para amarelo, ao redor da

inoculação, indicativa da produção de ácido a partir dos carboidratos testados (ISO 11290-1, 1998).

3.1.2. *Produção de β-hemólise*

As culturas foram estriadas na superfície de placas de petri contendo ágar TSA suplementado com sangue de carneiro desfibrinado a 5% (Laborclin, Brasil) e incubadas a 37 °C por 24 h, observando-se a formação de zonas transparentes ao redor das colônias, decorrentes da produção de β-hemolisina (ISO 11290-1, 1998).

3.1.3. *Teste de catalase*

As culturas foram estriadas na superfície de placas com TSA-YE e cobertas com gotas de peróxido de hidrogênio a 3% (Needs, Brasil), observando-se a formação de borbulhas decorrentes da produção de catalase (ISO 11290-1, 1998).

3.1.4. *Teste de motilidade*

As culturas foram inoculadas por picada em tubos contendo 3 mL de ágar motilidade (Listeria Motility Medium, HiMedia Laboratories, EUA), empregando-se agulhas de inoculação. Os tubos foram incubados por 7 dias a 25 °C, e observados diariamente quanto ao crescimento em formato de guarda-chuva no fundo do tubo de ensaio (ISO 11290-1, 1998).

3.1.5. Sequenciamento 16S rRNA

Para o sequenciamento, o DNA das culturas em caldo TSB-YE com 12-18 h de incubação a 37 °C foi extraído com o kit ZR Fungal/Bacterial DNA Kit (Zymo Research, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e pureza do DNA extraído foi determinada através de leitura da absorbância no espectrofotometro Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific, EUA) a 260 nm e a 280 nm, considerando-se adequada quando a razão resultante estava entre 1.7 e 1.9. O DNA foi mantido a -20 °C até o momento da amplificação.

O PCR foi realizado de acordo com Felske *et al.* (1997) utilizando os primers 8F: 5'-CAC GGA TCC AGA CTT TGA T(C/T)(A/C) TGG CTC AG-3' e 1512R: 5'-GTG AAG CTT ACG G(C/T)T AGC TTG TTA CGA CTT-3' e GoTaq® Master Mixes

(Promega Corporation, EUA). Os volumes utilizados foram: 4,0 µL do primer 8F a 10mM; 4,0 µL do primer 1512R a 10 mM; 50 µL de GoTaq® Master Mixes; 4,0 µL de DNA a 100 ng/µL e água ultrafiltrada para completar 100 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (Applied Byossystems® Veriti® 96 Well Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, EUA), efetuando-se a desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de amplificação a 94 °C por 10 s, 61 °C por 20 s e 68 °C por 2 min. A etapa final de extensão ocorreu a 72 °C por 7 min. Os produtos da amplificação foram mantidos a -20 °C.

Os produtos amplificados foram revelados por eletroforese em gel de agarose a 1% (Certified™ Molecular Biology Agarose, Invitrogen, EUA), empregando-se uma cuba horizontal Gel XL Ultra V-2 (Labnet International Inc., EUA). As condições de corrida foram 100 V por 40 minutos em tampão TBE 0,5X (89 nM Tris-Borato e 2 nM EDTA, pH 8.0). O gel foi corado com 3 µL de brometo de etídio (Pharmacia, Suécia) e as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta a 320 nm no aparelho Molecular Imager® Gel Doc™ XR + Imaging System (Bio-Rad Laboratories, EUA).

O sequenciamento dos nucleotídeos resultantes da amplificação foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo e os resultados analisados pelo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, NCBI) para confirmação da espécie das cepas testadas.

3.1.6. *Pesquisa de genes de virulência*

Para a pesquisa dos genes de virulência *lux*S, *plc*A, *inl*A, *inl*B, *inl*C, *inl*J, *hly*A, *act*A e *iap,* empregou-se PCR Simplex e Multiplex, de acordo com Camargo *et al.* (2016). As condições das reações estão descritas na Tabela 1, e os volumes utilizados foram: 2 µL de DNA a 100 ng/µL; 1 µL de cada primer a 10mM; 10 µL de GoTaq® Master Mixes e água ultrafiltrada para completar (20 µL). O DNA das culturas de *L. monocytogenes* foi extraído empregando-se o kit ZR Fungal/Bacterial DNA Kit. As amplificações foram realizadas em termociclador (Applied Byossystems® Veriti® 96 Well Thermal Cycler) e a revelação dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose na concentração de 1% ou 2%, usando 1 kb DNA ladder (Fermentas, ThermoFisher Scientific, EUA) e 100 bp DNA ladder (Fermentas, ThermoFisher Scientific, EUA) como marcadores moleculares. As corridas foram realizadas a 100 V por 40 minutos em tampão TBE

0,5X (89 nM Tris-Borato e 2 nM EDTA, pH 8.0). O gel foi corado com Syber^{TM} Safe DNA Gel Stain (1 µL/10 mL, Invitrogen, EUA) e as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta – 320 nm no aparelho Molecular Imager® Gel Doc^{TM} XR + Imaging System.

3.1.7. *Preparo das culturas de L. monocytogenes para os testes in vitro e in situ*

Para uso nos testes, as cepas de *L. monocytogenes* selecionadas foram inoculadas em caldo TSB-YE, incubando-se a 37 °C por 24 h. As culturas obtidas foram centrifugadas a 6000 xg (6-16k, Sigma Zentrifugen, Alemanha) por 5 min a 21 °C, removendo-se o sobrenadante e ressuspendendo o pellet em solução salina a 0,85% (Labsynth, Brasil). O procedimento foi repetido mais duas vezes. A suspensão final foi ajustada com solução salina a 0,85% até se obter uma turbidez equivalente à 0,5 da escala de McFarland (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, França), correspondente à população de 10^8 UFC/mL. Posteriormente, foi realizada uma diluição de 1:10 para se obter uma cultura com densidade populacional de 10^7 UFC/mL (CLSI 2003; 2015). As culturas padronizadas foram adicionadas, individualmente e em triplicata, aos poços de uma placa de microtitulação de 96 poços com fundo achatado (Cralplast, Brasil) contendo 190 µL de Caldo Mueller Hinton (Oxoid, Reino Unido). A placa foi incubada no Multiskan^{TM} FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific, EUA) por 24 h a 37 °C, com leituras de densidade óptica a 620 nm a cada 3 horas para determinação do tempo necessário para as culturas entrarem nas fases logarítmica e estacionária.

Tabela 1. Primers utilizados nos ensaios de PCR, de acordo com Camargo *et al.*, 2016

PCR	Gene alvo	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)	Condições de reação
Simplex	*lux*S	F: TGTTTTAGCGAAGACTTTAGCCGATGT R: TCCGCAAGCTCTTTTGCGCCT	117	20 µL, 94 °C por 5 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 53 ºC por 30 s, 72 °C por 30 s, 72 °C por 4 min
Simplex	*inl*B	F: TGGGAGAGTAACCCAACCAC R: GTTGACCTTCGATGGTTGCT	844	20 µL, 94 °C por 2 min, 30 ciclos a 94 °C por 20 s, 51 °C por 20 s, 72 °C por 50 s, 72 °C por 2 min
Simplex	*plc*A	F: CTGCTTGAGCGTTCATGTCTC ATCCCCC R: ATGGGTTTCACTCTCCTTCTAC	1484	20 µL, 95 °C por 2 min, 35 ciclos a 95 °C por 15 s, 51 °C por 30 s, 72 °C por 90 s, 72 °C por 10 min
Multiplex	*inl*A	F: ACGAGTAACGGGACAAATGC R: CCCGACAGTGGTGCTAGATT	800	20 µL, 94 °C por 2 min, 30 ciclos a 94 °C for 20 s, 55°C por 20 s, 72 °C por 50 s, 72 °C por 2 min
	*inl*C	F: AATTCCCACAGGACACAACC R: CGGGAATGCAATTTTTCACTA	517	
	*inl*J	F: TGTAACCCCGCTTACACAGTT R: AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	238	
Multiplex	*hly*A	F: GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA R: GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	456	20 µL, 95 °C por 2 min, 35 ciclos a 95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 90 s, 72 °C por 10 min
	*act*A	F: CGCCGCGGAAATTAAAAAAAGA R: ACGAAGGAACCGGGCTGCTAG	839	
	iap	F: ACAAGCTGCACCTGTTGCAG R: TGACAGCGTGTGTAGTAGCA	131	

3.2. *Compostos testados*

3.2.1. *Compostos empregados nos testes in vitro*

Os compostos testados quanto à atividade antimicrobiana *in vitro* (item 3.3) foram:

A) Lactato de sódio (Purasal® S), Corbion Purac, Estados Unidos;
B) Diacetato de sódio (Progusta SD®), Niacet Co., Estados Unidos;
C) Vinagre tamponado (BactoCEASE® NV), Kemin Industries Inc., Estados Unidos;
D) Extrato de alecrim (GUARDIAN® Rosemary Extract 08), DuPont™ Nutrition & Health, Dinamarca;
E) Nisina (Nisaplin®), DuPont™ Nutrition & Health, Dinamarca.

Com exceção do extrato de alecrim, os demais compostos foram solubilizados em água. Para a solubilização do extrato de alecrim, que é oleoso, foram testados os emulsificantes polissorbato 80 (Tween 80, Sigma Aldrich, EUA), polissorbato 20 (Tween 20, Sigma Aldrich, EUA) e dimetil sulfóxido (DMSO, Labsynth, Brasil), a 0,5%, 1% e 2% (concentração final) e Triton X-100 (Sigma-Aldrich, EUA), a 0,25%, 0,5% e 1% (concentração final). Os testes foram realizados em microtubos de capacidade de 1,5 mL (Axygen, Brasil), misturando-se 20 µL do extrato de alecrim com os emulsificantes nas diferentes concentrações, homogeneizando-se as misturas em um agitador de bancada (Kasvi, Brasil). Em seguida, adicionou-se água destilada em quantidade suficiente para completar o volume para 1 mL, homogeneizando-se novamente por 30 s. As misturas foram mantidas a 37 °C por 24 h, para verificação de sua estabilidade.

Com base nos resultados que indicaram ser o Triton X-100 o melhor emulsificante (0,25%), foi necessário verificar seu possível efeito tóxico sobre as cepas de *L. monocytogenes* empregadas na pesquisa. Trabalhando-se com placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato, misturou-se 100 µL de uma solução aquosa de Triton X-100 a 0,5% com 90 µL de Caldo Mueller Hinton, em triplicata. Em seguida, adicionou-se 10 µL de cada uma das culturas de *L. monocytogenes*, preparadas como descrito no item 3.1.7 e incubou-se a 37 °C por 24 h. O conteúdo

de cada poço foi submetido à diluição decimal seriada em solução salina a 0,85% em microtubos, transferindo-se 10 µL de cada diluição para a superfície de placas de TSA-YE para observação de presença de *L. monocytogenes* (CLSI, 2015).

3.2.2. *Compostos empregados nos testes in situ*

Os testes *in situ* foram realizados com o objetivo de avaliar a multiplicação de *Listeria monocytogenes* em mortadelas formuladas com os seguintes produtos comerciais e *blends* preparados e fornecidos pela empresa DuPont™ Nutrition & Health:

A) Lactato de sódio (Purasal® S), Corbion Purac, Estados Unidos.
B) BioVia® CL600: vinagre tamponado e dextrose, DuPont™ Nutrition & Health, Dinamarca;
C) NovaGARD® LM100: extrato de alecrim, diacetato de sódio, nisina livre e nisina encapsulada, DuPont™ Nutrition & Health, Dinamarca;
D) *Blend* 1: combinação de extrato de alecrim (GUARDIAN® Rosemary Extract 08, DuPont™ Nutrition & Health, Dinamarca), com vinagre tamponado (BactoCEASE® NV, Kemin Industries Inc., Estados Unidos) e Nisaplin® (DuPont™ Nutrition & Health, Dinamarca);
E) *Blend* 2: combinação de extrato de alecrim (GUARDIAN® Rosemary Extract 08, DuPont™ Nutrition & Health, Dinamarca), com vinagre tamponado (BactoCEASE® NV, Kemin Industries Inc., Estados Unidos), lactato de sódio (Purasal® S, Corbion Purac, Estados Unidos) e Nisaplin® (DuPont™ Nutrition & Health, Dinamarca);
F) *Blend* 3: combinação de extrato de alecrim (GUARDIAN® Rosemary Extract 08, DuPont™ Nutrition & Health, Dinamarca), lactato de sódio (Purasal® S, Corbion Purac, Estados Unidos) e Nisaplin® (DuPont™ Nutrition & Health, Dinamarca);
G) *Blend* 4: combinação de extrato de alecrim (GUARDIAN® Rosemary Extract 08, DuPont™ Nutrition & Health, Dinamarca), diacetato de sódio (Progusta SD®, Niacet Co., Estados Unidos), vinagre tamponado (BactoCEASE® NV, Kemin Industries Inc., Estados Unidos) e Nisaplin® (DuPont™ Nutrition & Health, Dinamarca).

3.3. *Determinação da atividade antimicrobiana in vitro*

Os compostos selecionados para os testes *in vitro* foram avaliados individualmente frente às cinco cepas de *L. monocytogenes* descritas no item 3.1, empregando-se a metodologia de microdiluição (CLSI 2003; 2015) em placas, conforme indicado na Tabela 2. Nos poços da coluna 1 da placa, adicionou-se 200 µL do composto em análise na concentração inicial, e nas colunas 2 a 10 adicionou-se 100 µL de Caldo Mueller Hinton. Em seguida, transferiu-se 100 µL do composto em análise da primeira coluna para a coluna seguinte, e assim sucessivamente até a coluna 10, com agitação por pipeta (BioPette™ Plus, Labnet International, EUA) entre cada transferência. A cada poço das colunas adicionou-se 90 µL de Caldo Mueller Hinton e 10 µL das culturas de *L. monocytogenes* padronizadas de acordo com o item 3.1.7. Em cada placa foram incluídos os seguintes controles: poços contendo somente Caldo Mueller Hinton (200 µL) e poços contendo a mistura de 190 µL de Caldo Mueller Hinton e 10 µL da cultura de *L. monocytogenes* em teste.

As placas de microtitulação foram incubadas a 37 ºC por 24 h, quando foram examinadas quanto à turbidez, comparando com os controles positivo e negativo, visualmente e com leitura espectrofotométrica a 620 nm (Multiskan™ FC Microplate Photometer). Para confirmar a presença de *L. monocytogenes*, 10 µL do conteúdo dos poços foram transferidos para placas de petri contendo ágar TSA-YE, que foram incubadas a 37 °C por 24 h e observadas quanto à presença de colônias características. Considerou-se como concentração inibitória mínima (CIM) do composto testado a ultima concentração em que o crescimento de *L. monocytogenes* nas placas de TSE-YE foi possível.

3.4. *Determinação de atividade antimicrobiana in situ (mortadela*)

3.4.1. *Controle da atividade antimicrobiana dos produtos comerciais e blends utilizados nos testes in situ*

Nessa etapa do trabalho, foram empregadas apenas as cepas de *L. monocytogenes* isoladas de produtos cárneos (cepas 500, 508 e 595). Os compostos utilizados nos testes *in situ* foram avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana *in vitro* contra as três cepas, individualmente e também combinadas em um *pool*. As culturas foram preparadas conforme descrito no item 3.1.7 e para o

Tabela 2. Concentrações dos compostos testados

Composto	Nome comercial	Concentração (%)									
Lactato de sódio	Purasal® S	60	30	15	7,5	3,8	1,9	0,9	0,5	0,2	0,1
Diacetato de sódio	Progusta SD®	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0,01
Vinagre tamponado	BactoCEASE® NV	100	50	25	12,5	6,25	3,1	1,5	0,8	0,4	0,2
Extrato de alecrim	GUARDIAN®	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0,015	0,008	0,004	0,002
Nisina	Nisaplin®	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	0,013	0,006	0,003	0,0015	0,0007

Tabela 3. Concentrações dos compostos empregados na avaliação de sua atividade antimicrobiana

Composto	Concentração (%)									
BioVia CL600®	10	5	2,5	1,25	0,6	0,3	0,15	0,07	0,03	0,02
NovaGARD® LM100	0,6	0,3	0,15	0,07	0,03	0,02	0,01	0,005	0,0025	0,0013
Blend 1	10	5	2,5	1,25	0,6	0,3	0,15	0,07	0,03	0,02
Blend 2	10	5	2,5	1,25	0,6	0,3	0,15	0,07	0,03	0,2
Blend 3	2,5	1,25	0,6	0,3	0,15	0,07	0,03	0,02	0,01	0,005
Blend 4	2,5	1,25	0,6	0,3	0,15	0,07	0,03	0,02	0,01	0,005

preparo do *pool*, misturou-se 2 mL de cada uma das culturas contendo 10^8 UFC/mL (item 3.1.7). As culturas individuais e o *pool* foram diluídos 1:10 em solução salina a 0,85% e submetidas à determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição (CLSI 2003; 2015), descrito no item 3.3. As concentrações testadas estão descritas na Tabela 3.

3.4.2. *Produção das mortadelas*

As mortadelas empregadas no estudo contendo os diferentes compostos avaliados foram produzidas no Centro de Tecnologias de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos (CTC-ITAL), Campinas, SP. Foram preparados três lotes, em três datas diferentes, sendo cada lote composto por mortadelas com sete formulações diferentes (Tabela 4), denominadas M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7, de acordo com o(s) composto(s) em estudo adicionado(s) (item 3.2).

Os ingredientes cárneos triturados foram misturados com os demais ingredientes em um misturador rotativo em refrigeração (SM 65, Krämer & Grebe, Alemanha) a 4000 rpm, até a massa de carne resultante atingir a temperatura de 12 °C. As massas obtidas foram embutidas em tripas artificiais de plástico (TPO2 ≤ 25 cm3/m2.dia, F10-60, Viscofan, Espanha) de 60 mm de calibre, utilizando uma embutideira a vácuo (VF610 Plus, Handtmann Ltd., Brasil). Os produtos embutidos foram cozidos em um forno a vapor (HR1, Schröter Technology, Alemanha), à temperatura inicial de 50 °C, com aumento gradativo de 5 °C a cada 10 min, até alcançar 85 °C. A temperatura interna dos produtos cozidos foi de 74 °C (Figura 1). As propriedades das mortadelas obtidas, conforme informado pelo Centro de Tecnologias de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos (CTC-ITAL), Campinas, SP, estão descritas na Tabela 5.

As mortadelas foram identificadas conforme descrito abaixo:

MA-1: mortadela do lote A, formulação 1

MA-2: mortadela do lote A, formulação 2

MA-3: mortadela do lote A, formulação 3

MA-4: mortadela do lote A, formulação 4

MA-5: mortadela do lote A, formulação 5

MA-6: mortadela do lote A, formulação 6

MA-7: mortadela do lote A, formulação 7
MB-1: mortadela do lote B, formulação 1
MB-2: mortadela do lote B, formulação 2
MB-3: mortadela do lote B, formulação 3
MB-4: mortadela do lote B, formulação 4
MB-5: mortadela do lote B, formulação 5
MB-6: mortadela do lote B, formulação 6
MB-7: mortadela do lote B, formulação 7
MC-1: mortadela do lote C, formulação 1
MC-2: mortadela do lote C, formulação 2
MC-3: mortadela do lote C, formulação 3
MC-4: mortadela do lote C, formulação 4
MC-5: mortadela do lote C, formulação 5
MC-6: mortadela do lote C, formulação 6
MC-7: mortadela do lote C, formulação 7

As mortadelas produzidas no Centro de Tecnologia de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos (CTC-ITAL), Campinas, SP, foram transportadas para o laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade de São Paulo em caixas de isopor com gelo reciclável e mantidas refrigeradas a 8 °C até o inicio dos testes, geralmente em menos de 24 h.

Figura 1. Etapas da produção de mortadelas

Fonte: a autora (2018)

Tabela 4. Composição das mortadelas M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7

	M1 (%)	**M2 (%)**	**M3 (%)**	**M4 (%)**	**M5 (%)**	**M6 (%)**	**M7 (%)**
Carne de frango mecanicamente separada (20% de gordura)	60,0	60,0	60,0	60,0	60,0	60,0	60,0
Toucinho de porco em cubos (83% de gordura)	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Banha de porco (80% de gordura)	6,0	6,2	7,15	5,95	4,8	4,8	5,95
Carne de porco	8,2	8,2	8,2	8,1	7,45	7,45	8,1
Carmin 3%	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Amido de tapioca	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Água/gelo	7.2	8.0	7.8	8.1	7.9	7.9	8.1
Sal com 10% de nitrito de sódio	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Sal	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Tripolifosfato de Sódio	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Condimentos Kerry ME 86B	1.0	1.0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Glutamato monossódico	0,1	0,1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Eritorbato	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Proteina de soja SUPRO 548 (DuPont Danisco)	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7
Lactato de sódio	2,0						
Biovia CL600 (DuPont Danisco)		1,0					
Novagard LM100 (DuPont Danisco)			0,25				
Blend 1				1,25			
Blend 2					1,25		
Blend 3						1,25	
Blend 4							1,25
Total	100	100	100	100	100	100	100

Tabela 5. Propriedades* das mortadelas

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Proteína total (%)	12,50	12,20	12,21	12,18	12,05	12,05	12.18
Colágeno (%)	0,83	0,83	0,84	0,83	0,81	0,81	0.83
Colágeno/proteína total	6,80	6,82	6,88	6,80	6,70	6,70	6,80
Gorduras (%)	22,64	22,80	23,56	22,59	21,58	21,58	22,59
Carboidratos (%)	6,73	6,73	5,98	6,98	7,98	7,98	6,98
Cinzas (%)	2,47	2,27	2,27	2,27	2,47	2,47	2,27
Umidade (%)	55,96	56,00	55,98	55,99	55,92	55,92	55,99
Umidade/proteína	4,59	4,59	4,59	4,60	4,64	4,64	4,60
ph*	6,85	6,44	6,40	6,83	6,70	6,73	6,53
Atividade de água*	0,963	0,969	0,971	0,965	0,961	0,965	0,965

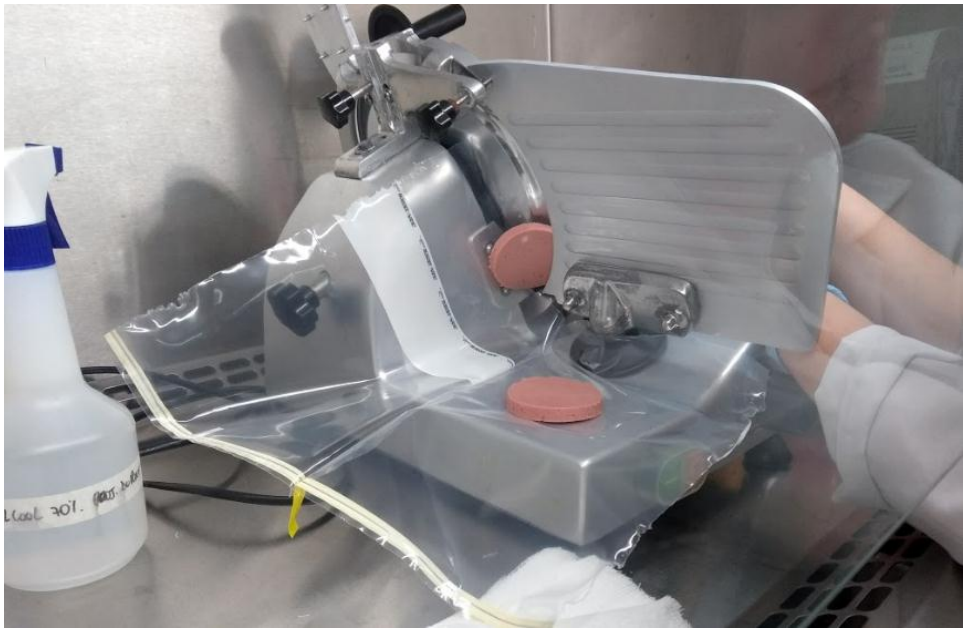
M1 = lactato de sódio; M2 = BioVia® CL600; M3 = Novagard® LM100; M4 = extrato de alecrim + vinagre tamponado + Nisaplin®; M5 = extrato de alecrim + vinagre tamponado + lactato de sódio + Nisaplin®; M6 = extrato de alecrim + lactato de sódio + Nisaplin®; M7 = extrato de alecrim + diacetato de sódio + vinagre tamponado + Nisaplin®.

*Propriedades informadas pelo Centro de Tecnologia de Carnes, Instituto de Tecnologia de Alimentos (CTC-ITAL), Campinas, SP.

3.4.3. *Preparo das amostras de mortadela para os testes*

Uma vez recebidas no laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, as mortadelas foram fatiadas em um fatiador semi-automático (SMS-048, Urano, Brasil). De cada mortadela foram obtidas 42 fatias, com espessura aproximada de 0,5 cm e peso aproximado de 25 g (Figura 2). Cada fatia foi transferida individualmente para um saco plástico esterilizado (Whirl-pak, Nasco, EUA), com capacidade de 1627 mL.

Figura 2. Obtenção das fatias de mortadela



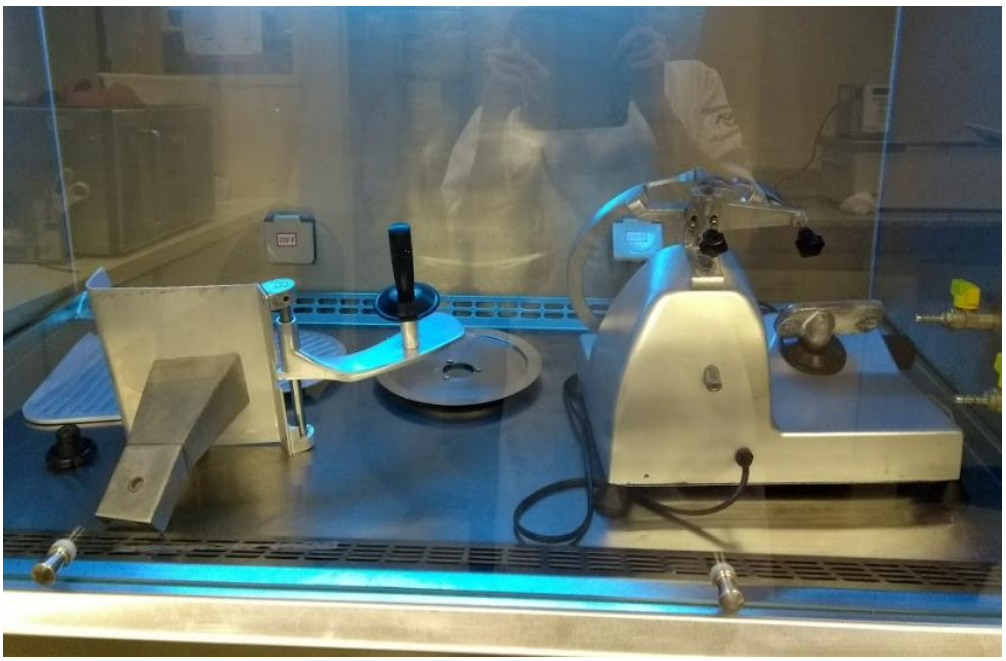
Fonte: a autora (2018)

Antes da utilização do fatiador, as peças removíveis foram retiradas e colocadas em um banho (Figura 3) com detergente alcalino a 5% (Extran MA1 Alcalino, Alpax, Labsynth, Brasil) por 12 h para remoção da gordura. As partes fixas do fatiador foram higienizadas com esponja macia e detergente neutro. As peças do fatiador foram retiradas do banho, lavadas com água corrente e, posteriormente, com água destilada e colocadas em uma capela de fluxo laminar (FLH-KE, Trox Technik, São Paulo) para secar. As peças secas foram expostas à luz UV por 30 min, em diferentes posições (Figura 4). O fatiador foi remontado, aplicando-se álcool 70% para a sanitização. A operação era repetida a cada lote de mortadelas a serem fatiadas.

Figura 3. Peças do fatiador em banho com detergente alcalino

Fonte: a autora (2018)

Figura 4. Aplicação de luz ultravioleta nas peças do fatiador



Fonte: a autora (2018)

3.4.4. *Contaminação experimental das fatias de mortadela*

A contaminação experimental das fatias de mortadela com *L. monocytogenes* foi realizada de acordo com o recomendado pelo National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF, 2010).

As culturas individuais das cepas *L. monocytogenes* 500, 508 e 595, preparadas em caldo TSB-YE incubado a 37 °C por 12 h foram padronizadas a uma população de 10^8 UFC/mL conforme descrito no item 3.1.7. Para o preparo do *pool*, misturou-se 2 mL de cada uma das culturas contendo 10^8 UFC/mL e, posteriormente, transferiu-se 600 µL dessa mistura para 600 mL de solução salina a 0,85%, obtendo-se 10^5 UFC/mL. A concentração exata foi determinada através de diluição decimal seriada em solução salina a 0,85%, seguida de semeadura por superfície em placas de petri contendo TSA-YE e incubação a 37 °C por 24 h.

Para inoculação nas mortadelas, cada saco contendo a fatia de 25 g foi inoculado com 250 µL do *pool* de culturas de *L. monocytogenes*. Os sacos plásticos foram selados a vácuo (AP-500, Tec Maq, Brasil) e massageados manualmente, de forma a assegurar a distribuição uniforme do inóculo na superfície da fatia (Brasileiro *et al.*, 2016). Os sacos foram imediatamente refrigerados a 8 °C.

Antes da contaminação experimental, uma das fatias de cada lote de mortadelas foi testada quanto à ausência de *L. monocytogenes,* empregando-se a metodologia ISO 11290-1:1998 (International Organization for Standardization, 1998). Colônias suspeitas de *L. monocytogenes* eventualmente presentes foram submetidas à provas bioquímicas, conforme descrito anteriormente (item 3.1).

3.4.5. *Contagem de L. monocytogenes nas fatias de m*ortadela

As fatias das mortadelas experimentalmente contaminadas foram submetidas à contagem de *L. monocytogenes* nos tempos 1, 2, 5, 7, 10, 14, 17, 21, 28, 35, 47, 56 e 70 dias. Duas fatias de cada mortadela eram transferidas dos sacos plásticos em que estavam para novos sacos de amostragem com filtro (Whirl-pak, Nasco, EUA), aos quais foi adicionada solução salina a 0,85%, de forma a atingir a proporção 1:10. Os sacos foram colocados em Stomacher (Biomerieux AS, Marcy l'etoile, França) por 3 min para homogeneização. O material resultante foi submetido à diluição decimal seriada em solução salina a 0,85%, e alíquotas de 0,5 mL de cada diluição foram semeadas em superfície de duas placas de petri contendo ágar Oxford,

totalizando inoculação de 1 mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, realizando-se a contagem das colônias com halo preto. Os resultados médios foram expressos em log UFC/g.

3.5. *Análise estatística*

As contagens de *L. monocytogenes* realizadas nas diferentes mortadelas (formulações M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7) para um mesmo tempo de incubação em refrigeração foram submetidas à análise de variância ANOVA e Teste de Tukey para verificar a significância das diferenças entre elas, considerando grau de confiança de 95% ($p<0,05$). O software utilizado para tais testes foi Minitab® 17 (Minitab Inc., EUA).

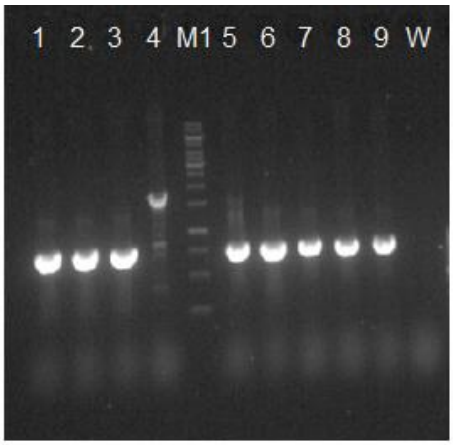
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *Cepas de Listeria monocytogenes*

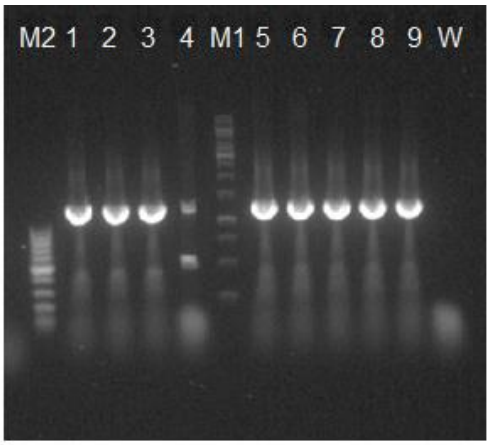
Os testes bioquímicos e moleculares confirmaram a espécie e virulência de todas as cepas de *Listeria monocytogenes* empregadas no estudo. Todas foram fermentadoras de dextrose e ramnose, porém não realizaram a fermentação de xilose e manitol. Todas foram catalase positiva e apresentaram motilidade característica de *Listeria*, em formato de guarda-chuva. Os resultados do sequenciamento do 16s rRNA apresentaram entre 96% e 98% de compatibilidade com *L. monocytogenes*, de acordo com o Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Os resultados da pesquisa de genes de virulência estão apresentados na Figura 5. As cinco cepas apresentaram resultados positivos para todos os genes: *lux*S, *inl*B, *plc*A, *inl*J, *inl*A, *inl*C, *hly*A, *act*A e *iap*.

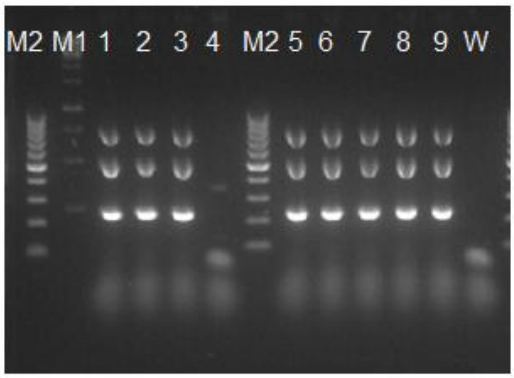
Figura 5. Genes de virulência nas cepas de *L. monocytogenes* testadas



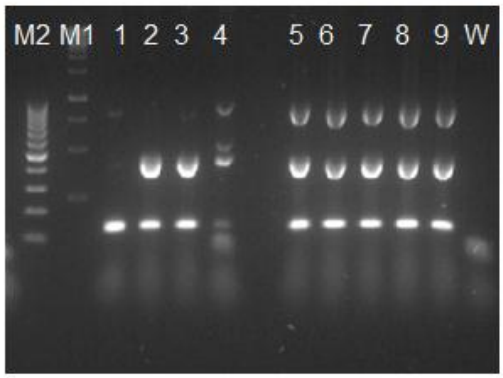
***inl*B**



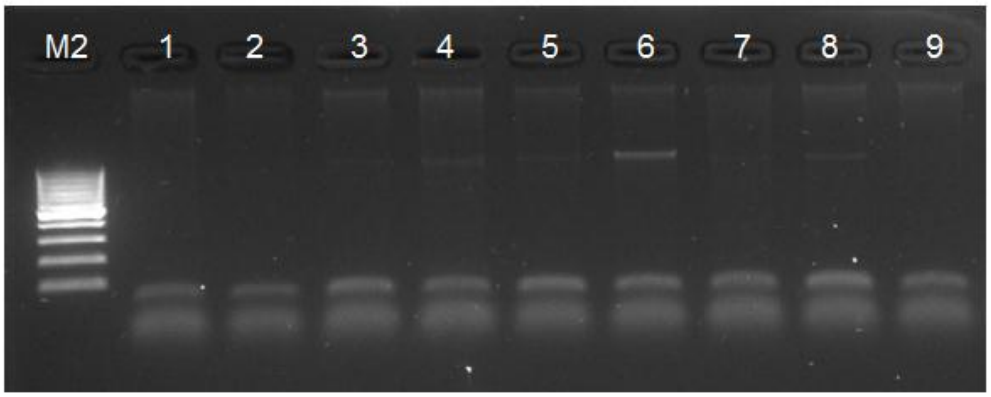
***plc*A**



***inl*J, *inl*A, *inl*C (Multiplex)**



***hlyA*, *act*A, *iap* (Multiplex)**



***lux*S**

M1 (1kb DNA ladder); M2 (100 bp DNA ladder); W: água; 1: *L. monocytogenes* 104; 2: *L. monocytogenes* 711; 3: *L. monocytogenes* 637; 4: *L. monocytogenes* ATCC 7644; 5: *L. monocytogenes* 500; 6: *L. monocytogenes* 508; 7: *L. monocytogenes* 595; 8: *L. monocytogenes* ATCC 7644; 9: *L. monocytogenes* Scott A

4.2. *Determinação da atividade antimicrobiana in vitro*

Os resultados referentes à solubilização do extrato de alecrim indicaram que o Triton X-100 foi o melhor emulsificante, uma vez que os emulsificantes polissorbato 80, polissorbato 20 e DMSO a 0,5%, 1% e 2% resultaram em emulsões não estáveis. Conforme indicado na Tabela 6, o Triton X-100 a 0,25% apresentou pequeno ou nenhum efeito tóxico sobre as culturas de *L. monocytgenes* utilizadas no presente estudo.

Tabela 6. Efeito do Triton X-100 a 0,25% sobre a contagem (log UFC/mL) de *Listeria monocytogenes*

Cepas	Triton X-100	Controle Positivo
500	6,9±0,1	7,8±0,1
508	7,5±0,1	7,5±0,1
595	6,6±0,2	7,5±0,1
ATCC 7644	7,3±0,0	8,3±0,2
Scott A	7,5±0,0	8,2±0,0

Os valores de densidade óptica atingidos pelas culturas de *L. monocytogenes* 500, 508, 595, ATCC 7644 e Scott A dos testes de atividade antimicrobiana *in vitro* frente ao lactato de sódio, diacetato de sódio, vinagre tamponado, extrato de alecrim e Nisaplin® estão apresentados nas Figuras 6, 7, 8, 9 e 10, respectivamente. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) estão apresentados na Tabela 7.

Os resultados indicam que os compostos diacetato de sódio, extrato de alecrim e Nisaplin® foram os mais eficazes na inibição das cepas testadas. A CIM para o diacetato de sódio variou de 1% a 2%, dependendo da cepa analisada. Porém, essas concentrações ultrapassam o limite de uso permitido em produtos cárneos pela legislação americana: 0,25% do peso final do produto (USFDA, 2000).

A CIM determinada para o extrato de alecrim variou de 0,03% a 0,06%, também dependendo da cepa. Segundo Nikmaram *et al.* (2018), extratos de plantas são reconhecidos pela sua atividade antimicrobiana, mesmo que em baixas

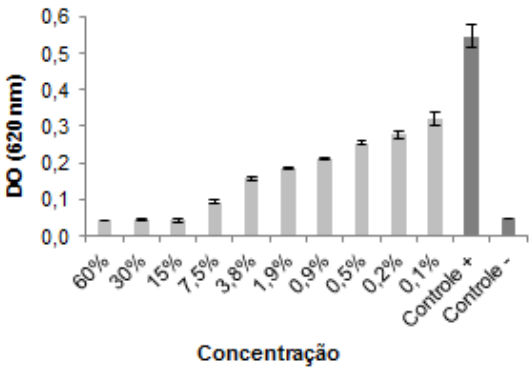
concentrações, sendo 0,01% suficiente para controlar o crescimento de microrganismos.

Quanto ao composto a base de nisina (Nisaplin®), foi necessário 0,05% para inibir as cepas de *L. monocytogenes*, com exceção da cepa 508, que teve sua multiplicação controlada com metade dessa concentração (0,025%).

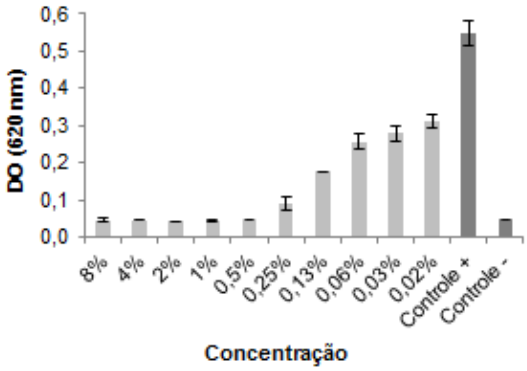
Não foi possível determinar a CIM para o lactato de sódio, que mesmo na concentração máxima testada (60%) não inibiu nenhuma das cepas de *L. monocytogenes*. Segundo Horita *et al.* (2018), a concentração de lactato de sódio aplicada pela indústria de carnes em produtos prontos para consumo é de aproximadamente 2-3%.

No caso do vinagre tamponado, o valor de CIM esteve entre 25% e 50%, que são valores altos e de pouca aplicação na indústria.

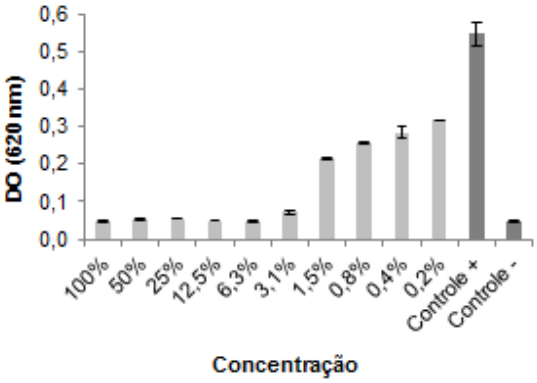
Figura 6. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 500 frente ao lactato de sódio (A), diacetato de sódio (B), vinagre tamponado (C), extrato de alecrim (D) e Nisaplin® (E)



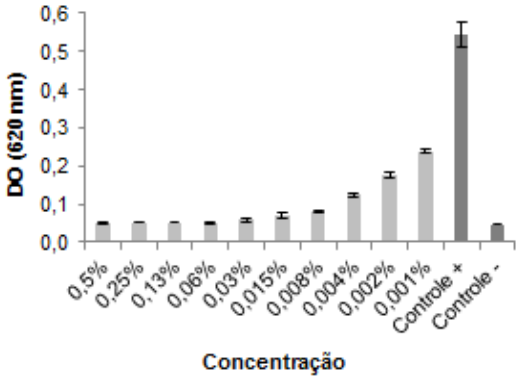
(A)



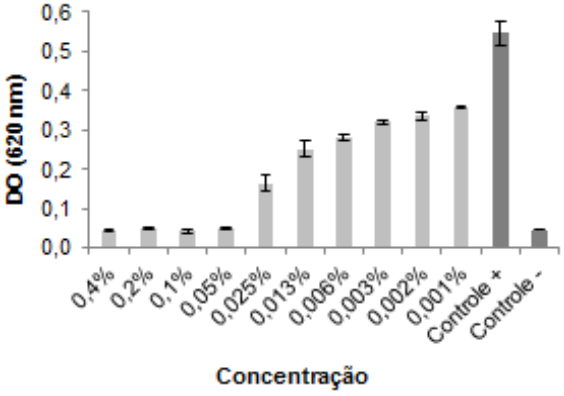
(B)



(C)

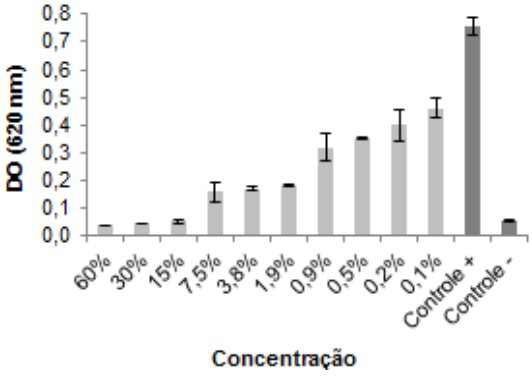


(D)

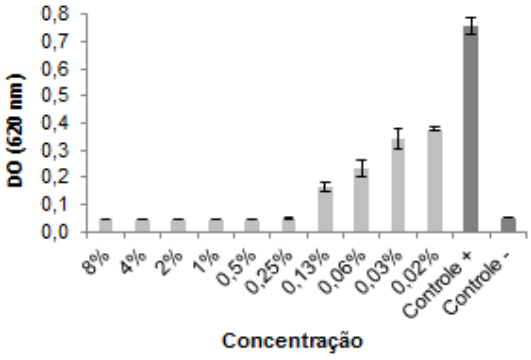


(E)

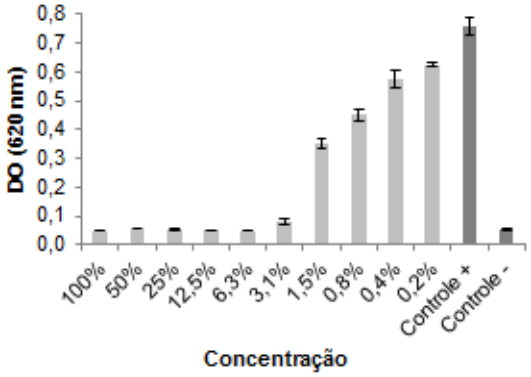
Figura 7. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 508 frente ao lactato de sódio (A), diacetato de sódio (B), vinagre tamponado (C), extrato de alecrim (D) e Nisaplin® (E)



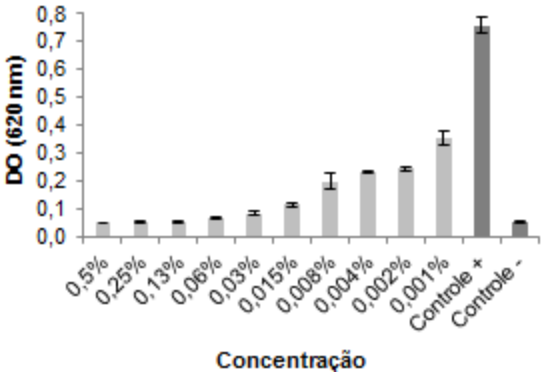
(A)



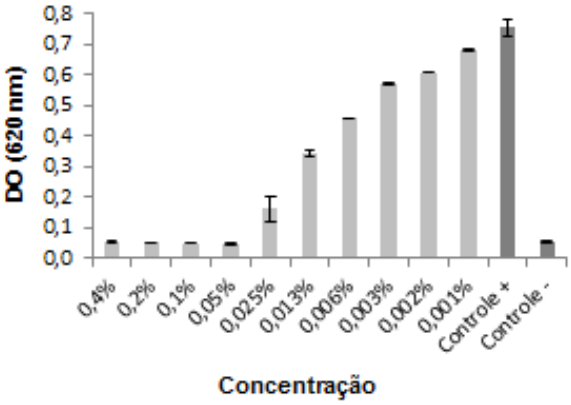
(B)



(C)

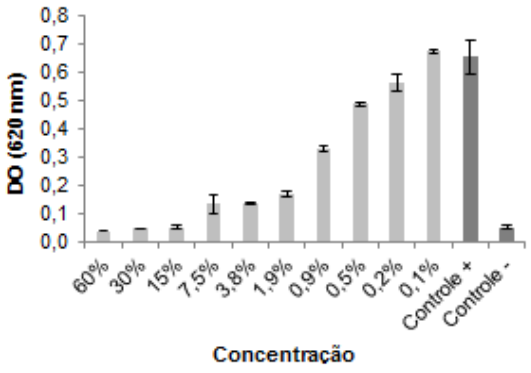


(D)

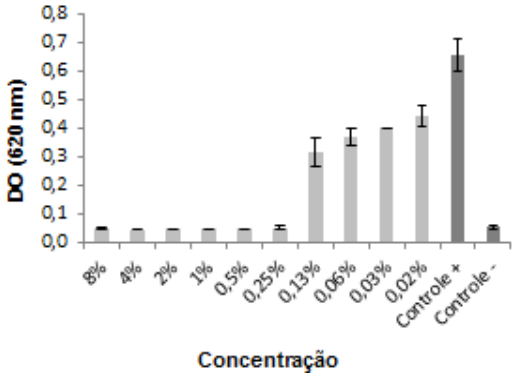


(E)

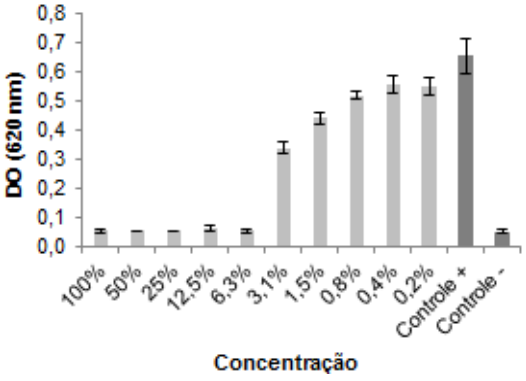
Figura 8. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 595 frente ao lactato de sódio (A), diacetato de sódio (B), vinagre tamponado (C), extrato de alecrim (D) e Nisaplin® (E)



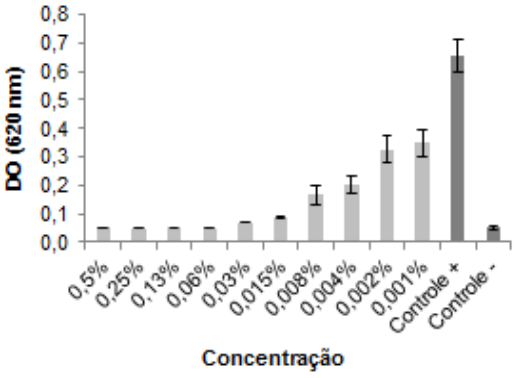
(A)



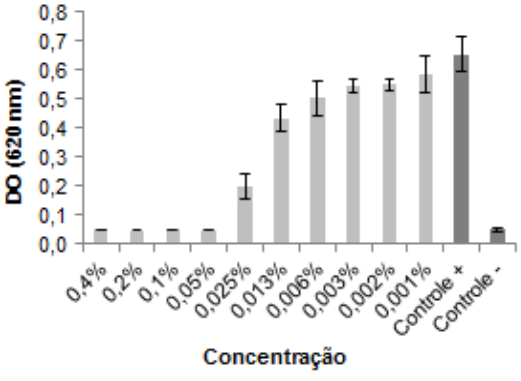
(B)



(C)

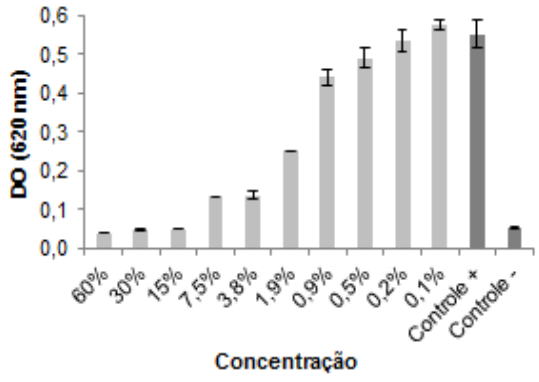


(D)

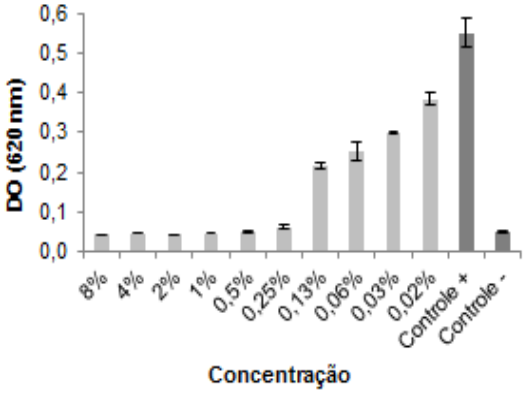


(E)

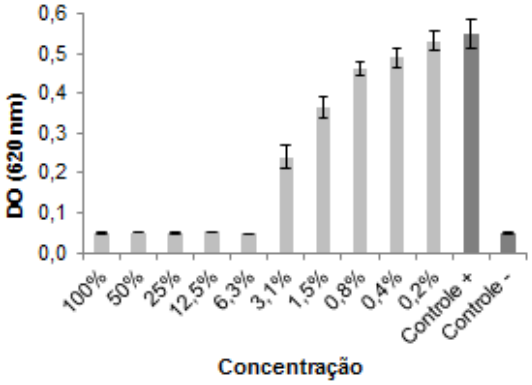
Figura 9. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* ATCC 7644 frente ao lactato de sódio (A), diacetato de sódio (B), vinagre tamponado (C), extrato de alecrim (D) e Nisaplin® (E)



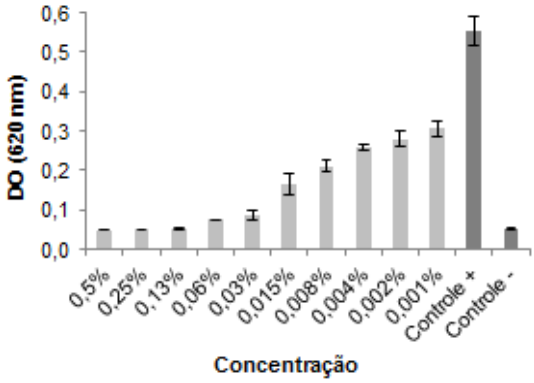
(A)



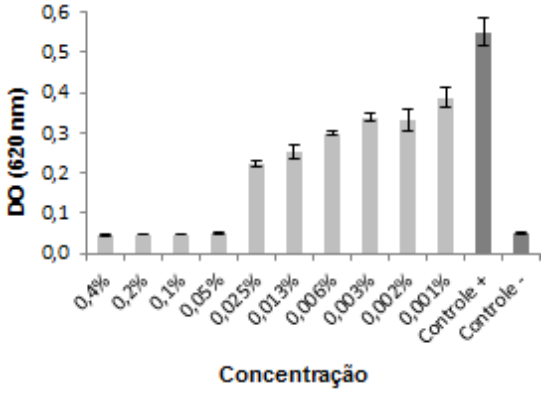
(B)



(C)

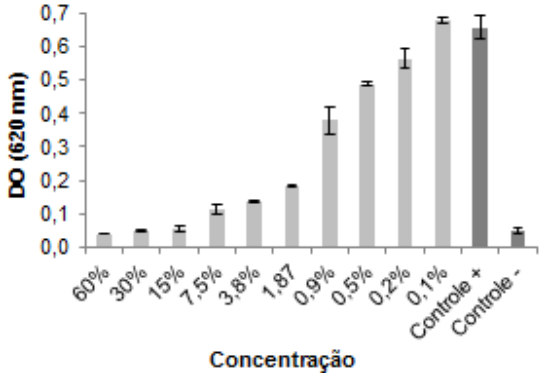


(D)

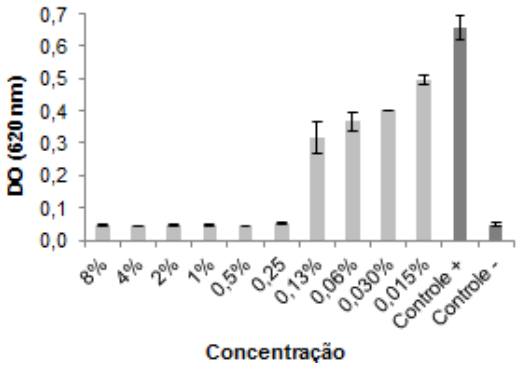


(E)

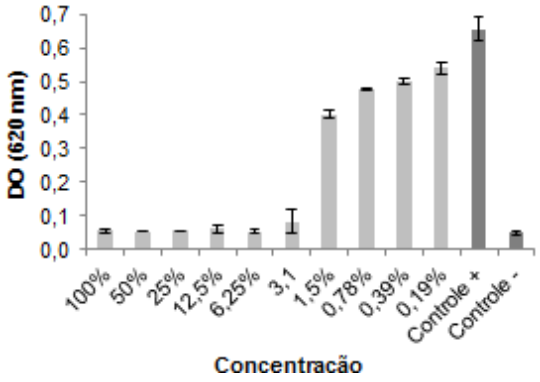
Figura 10. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* Scott A frente ao lactato de sódio (A), diacetato de sódio (B), vinagre tamponado (C), extrato de alecrim (D) e Nisaplin® (E)



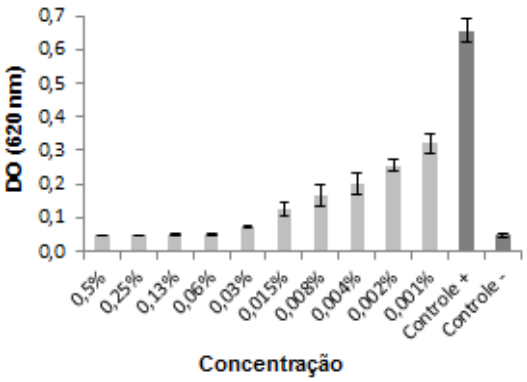
(A)



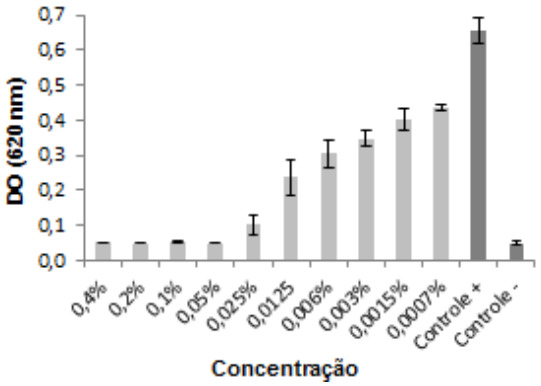
(B)



(C)



(D)



(E)

Tabela 7. Valores de CIM para lactato de sódio, diacetato de sódio, vinagre tamponado, extrato de alecrim e Nisaplin®, determinados para as cepas *L. monocytogenes* 500, 508, 595, ATCC 7644 e Scott A

Compostos	**500**	**508**	**585**	**ATCC 7644**	**Scott A**
Lactato de sódio	60%	60%	60%	60%	60%
Diacetato de sódio	1%	2%	1%	2%	1%
Vinagre tamponado	25%	25%	25%	25%	25%
Extrato de alecrim	0,06%	0,06%	0,03%	0,06%	0,03%
Nisaplin®	0,05%	0,025%	0,05%	0,05%	0,05%

CIM: concentração inibitória mínima

4.3. *Determinação da atividade antimicrobiana in situ (mortadela)*

4.3.1. *Controle da atividade antimicrobiana dos produtos comerciais e blends utilizados nos testes in situ*

Os resultados dos testes de atividade antimicrobiana dos produtos comerciais e *blends* empregados nos testes *in situ* nos lotes A e B de mortadela frente as cepas *L. monocytogenes* 500, 508 e 595, e também do *pool* dessas cepas estão apresentados nas Figuras 11, 12, 13 e 14, enquanto a Tabela 8 indica os resultados de CIM. Nas Figuras 15, 16, 17 e 18 e Tabela 9 são apresentados os resultados referentes aos produtos comerciais e *blends* utilizados nos testes in situ no lote C de mortadela.

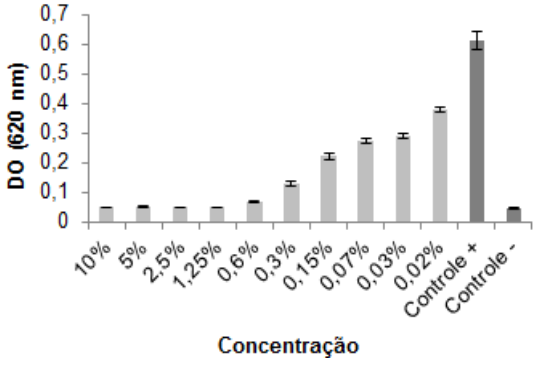
Os resultados indicam que todos os produtos comerciais e *blends* inibiram *L. monocytogenes*, com exceção da cepa 595 e do *pool*, que não foram inibidos pelos *blends* 1 (extrato de alecrim + vinagre tamponado + Nisaplin®) e 2 (extrato de alecrim + vinagre tamponado + lactato de sódio + Nisaplin®).

O *blend* 3 (extrato de alecrim + lactato de sódio + Nisaplin®) e o *blend* 4 (extrato de alecrim + diacetato de sódio + vinagre tamponado + Nisaplin®) apresentaram valor de CIM semelhante: 0,03% ou 0,07%, conforme a cepa. Foi possível observar que o diacetato de sódio e o vinagre tamponado interferiram nos resultados de inibição das cepas de *L. monocytogenes* no *blend* 4, pois esse *blend* foi capaz de inibir as cepas com metade da concentração do *blend* 2. O antimicrobiano comercial NovaGARD® LM100 apresentou valor de CIM entre 0,02% e 0,03%, dependendo da cepa testada, muito próximo ao observado para o *blends* 3 e 4.

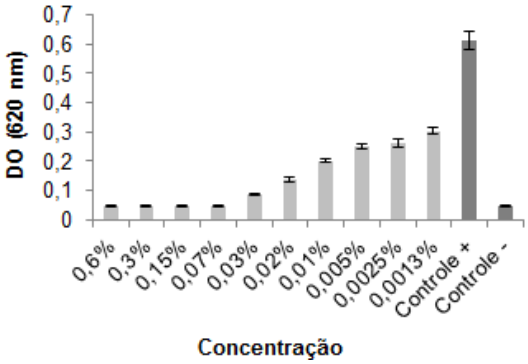
A CIM para o *blend* 2, contendo extrato de alecrim + vinagre tamponado + lactato de sódio + Nisaplin®, foi 0,03% as cepas 500 e 508, mas foi mais alta (5%) frente a cepa 595 e o *pool* de cepas. O mesmo foi observado nos testes com o *blend* 1 à base de extrato de alecrim + vinagre tamponado + Nisaplin®.

Em relação ao BioVia® CL600, este produto comercial foi menos eficaz que os os *blends* estudados na inibição *in vitro* das cepas de *L. monocytogenes*, apresentando CIM entre 0,6% e 1,25%, dependendo da cepa. Esse resultado pode ser explicado pela composição desse produto, que contém apenas vinagre tamponado e dextrose.

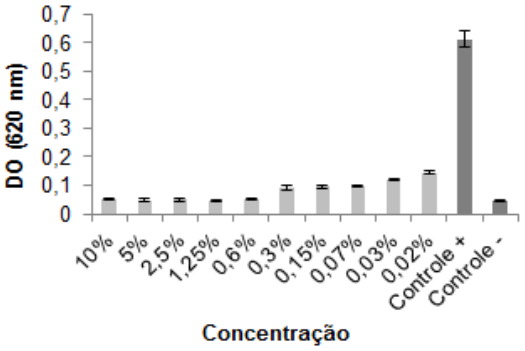
Figura 11. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 500 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados nos lotes A e B de mortadela



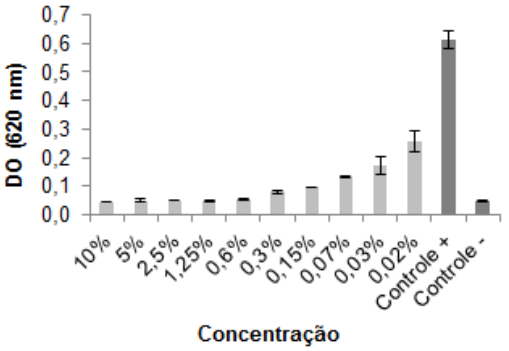
BioVia® CL600



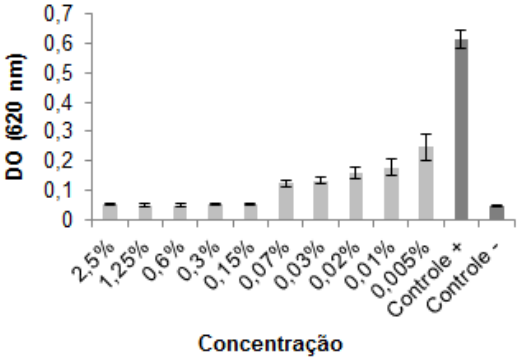
NovaGARD® LM100



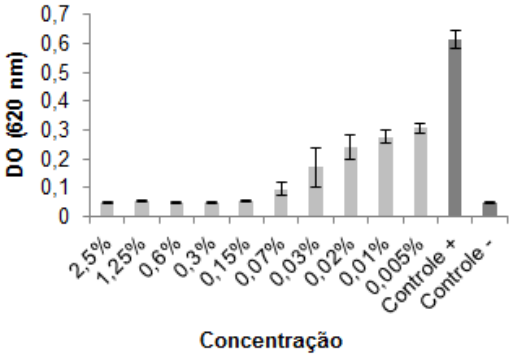
***Blend* 1**



***Blend* 2**

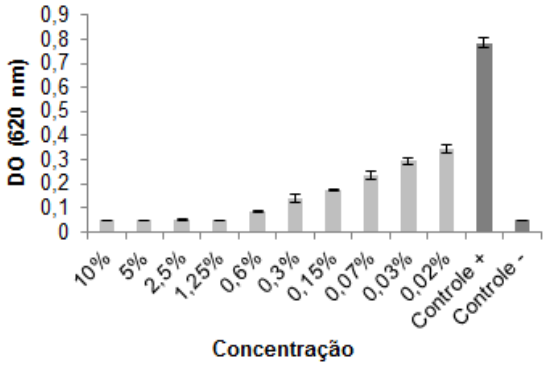


***Blend* 3**

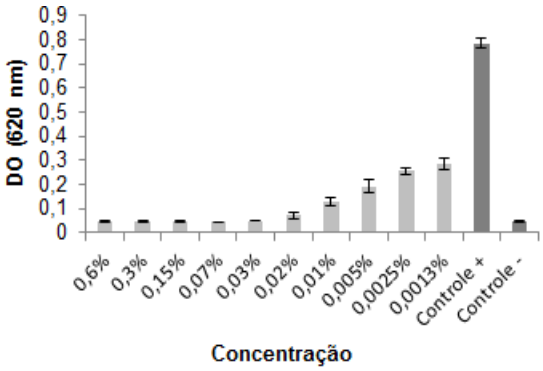


***Blend* 4**

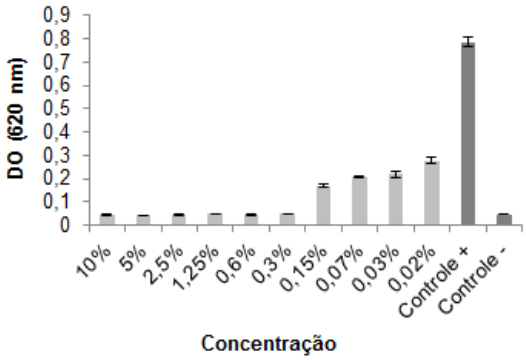
Figura 12. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 508 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados nos lotes A e B de mortadela



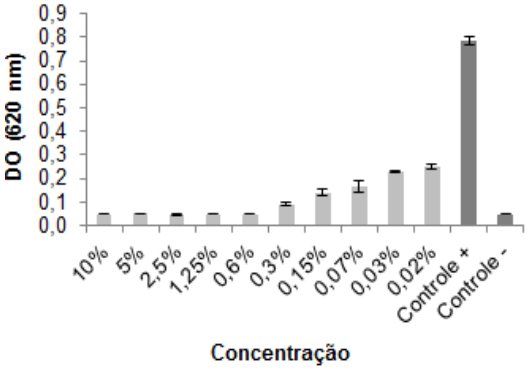
BioVia® CL600



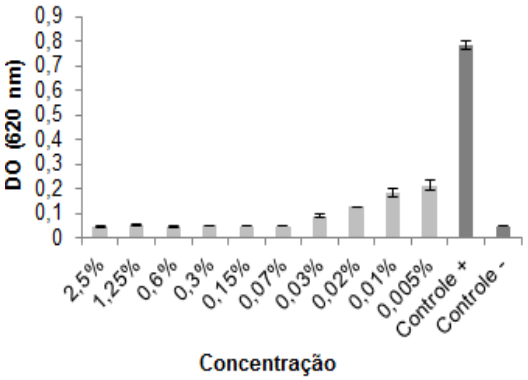
NovaGARD® LM100



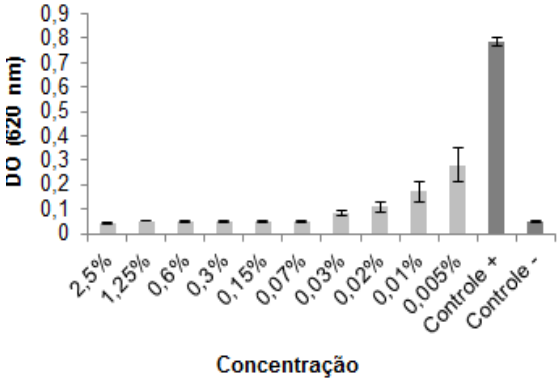
***Blend* 1**



***Blend* 2**

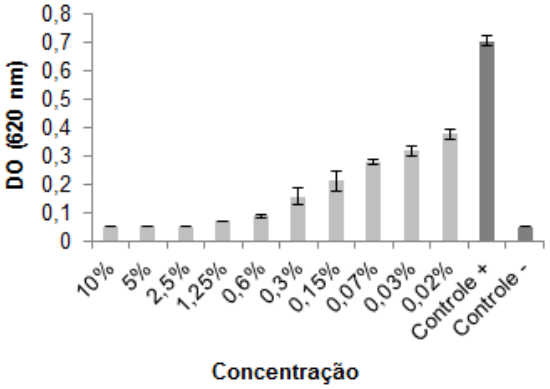


***Blend* 3**

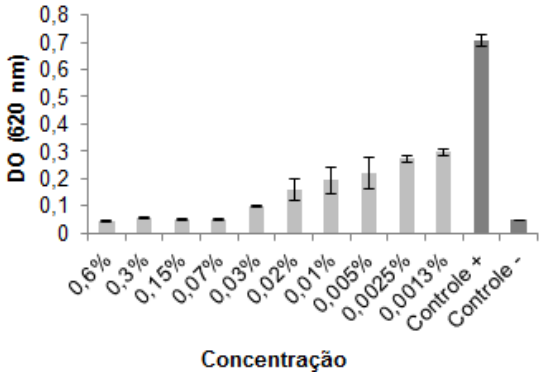


***Blend* 4**

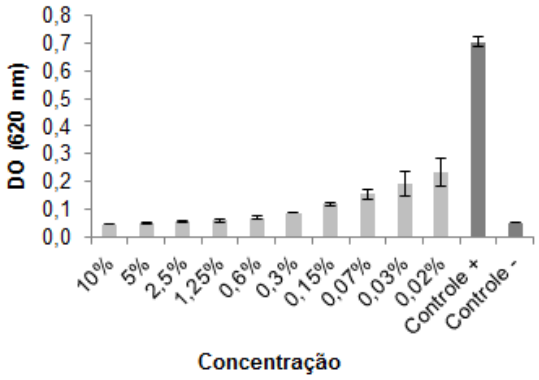
Figura 13. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 595 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados nos lotes A e B de mortadela



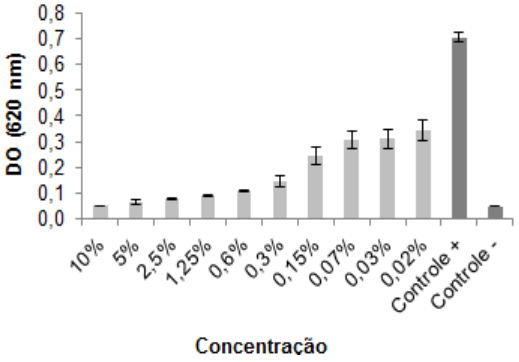
BioVia® CL600



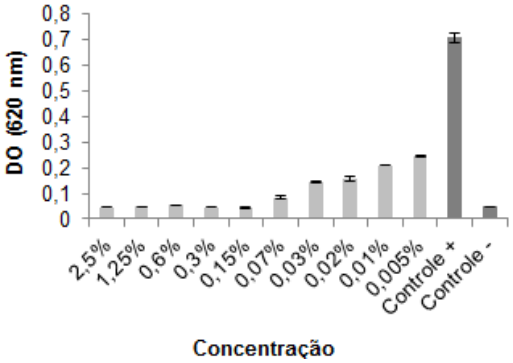
NovaGARD® LM100



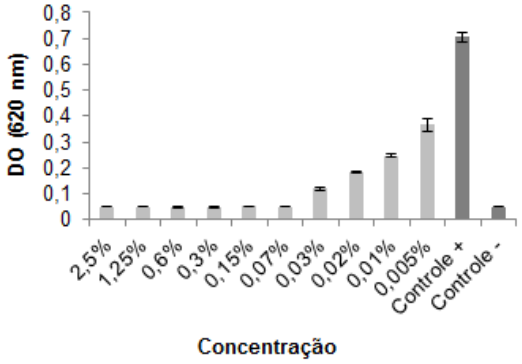
***Blend* 1**



***Blend* 2**

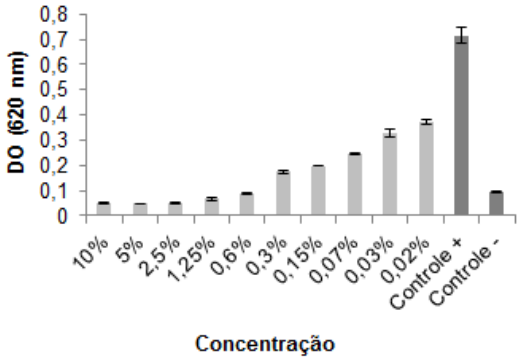


***Blend* 3**

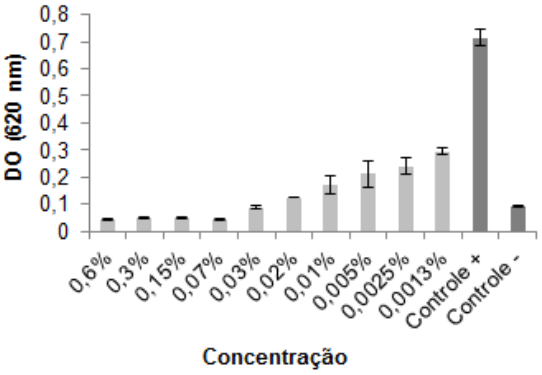


***Blend* 4**

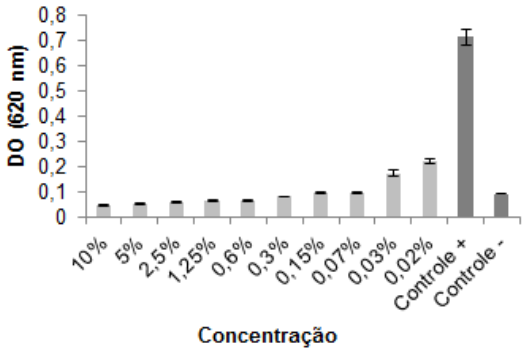
Figura 14. Densidade óptica (620 nm) do *pool* de culturas de *L. monocytogenes* 500, 508 e 595 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados nos lotes A e B de mortadela



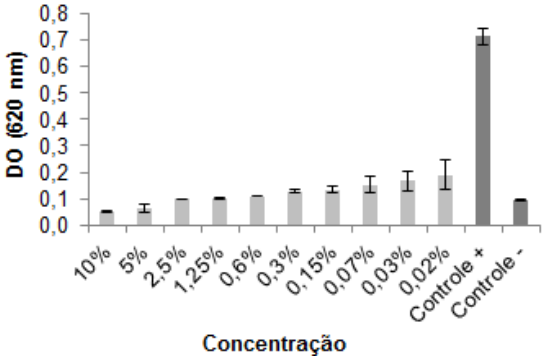
BioVia® CL600



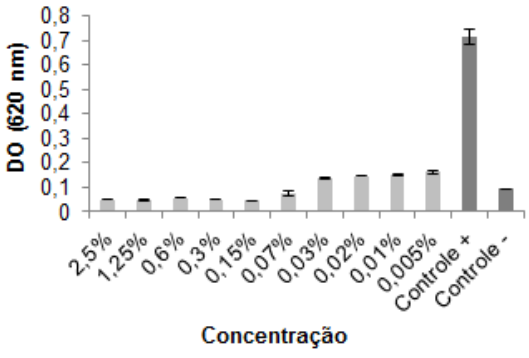
NovaGARD® LM100



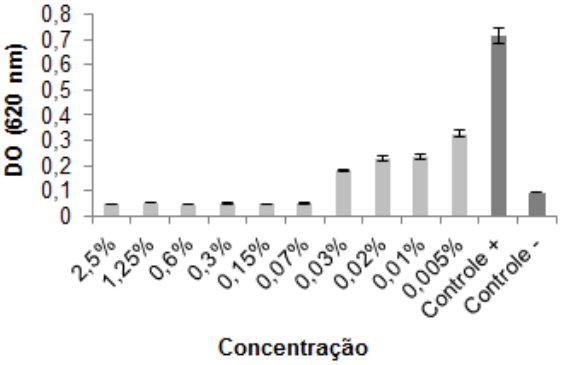
***Blend* 1**



***Blend* 2**



***Blend* 3**



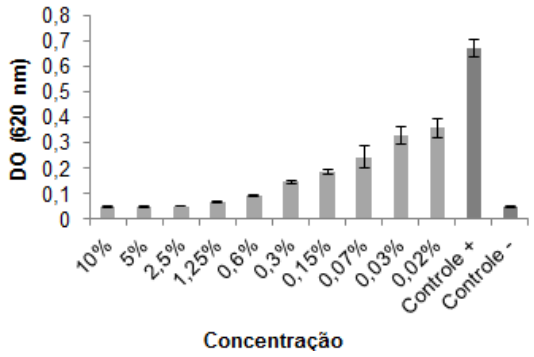
***Blend* 4**

Tabela 8. Valores de CIM dos produtos comerciais e *blends* utilizados nos lotes A e B de mortadela frente as cepas *L. monocytogenes* 500, 508 e 595 e o *pool* dessas cepas

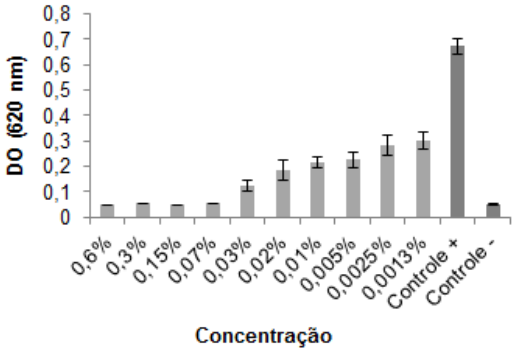
Compostos	**500**	**508**	**595**	***Pool***
BioVia® CL600	0,6%	0,6%	1,25%	1,25%
NovaGARD® LM100	0,03%	0,02%	0,03%	0,03%
Blend 1	0,3%	0,15%	5%	5%
Blend 2	0,3%	0,3%	5%	5%
Blend 3	0,07%	0,03%	0,07%	0,07%
Blend 4	0,07%	0,03%	0,03%	0,03%

CIM: concentração inibitória mínima

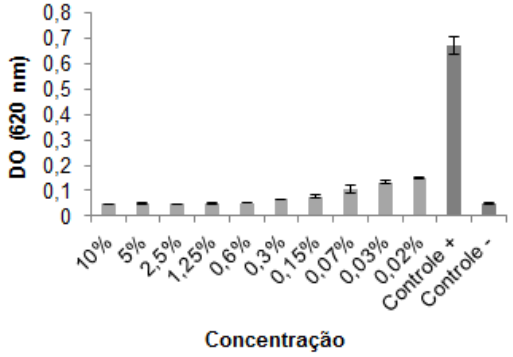
Figura 15. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 500 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados no lote C de mortadela



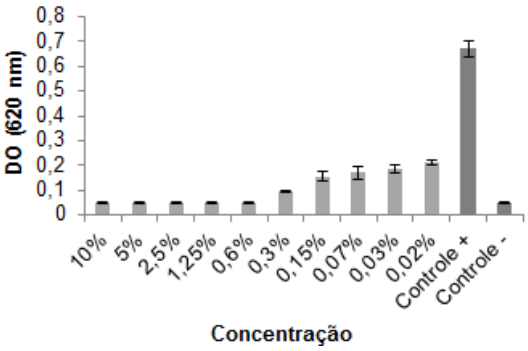
BioVia® CL600



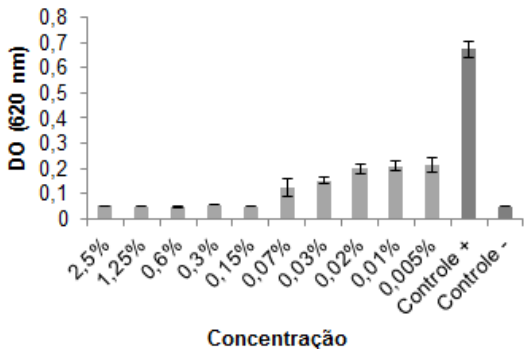
NovaGARD ® LM100



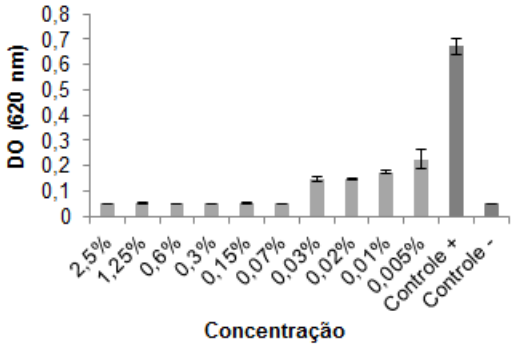
***Blend* 1**



***Blend* 2**

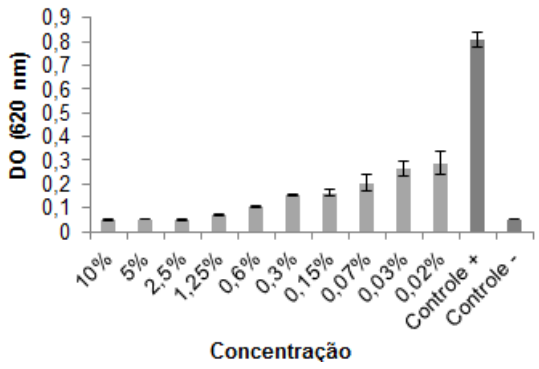


***Blend* 3**

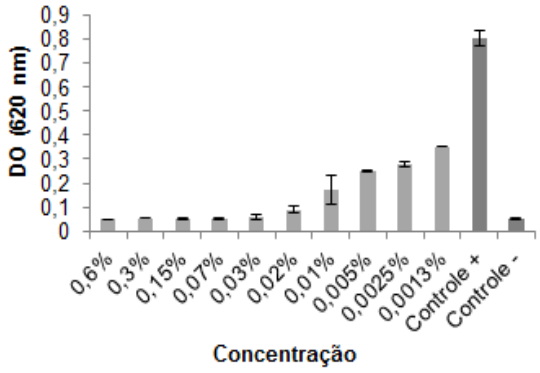


***Blend* 4**

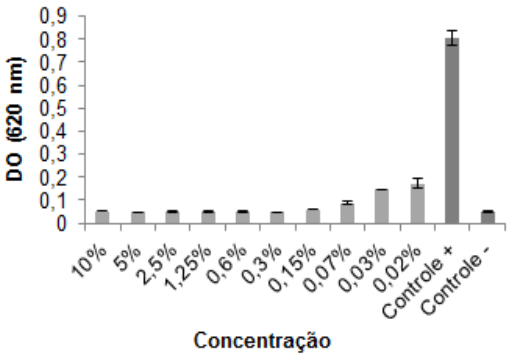
Figura 16. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 508 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados no lote C de mortadela



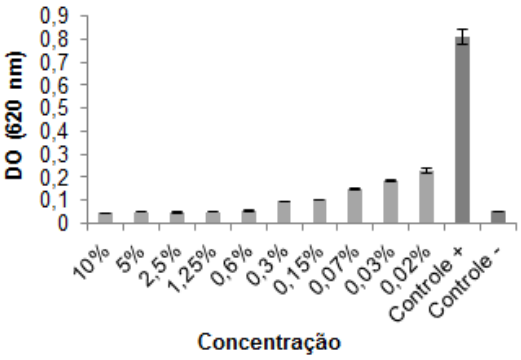
BioVia® CL600



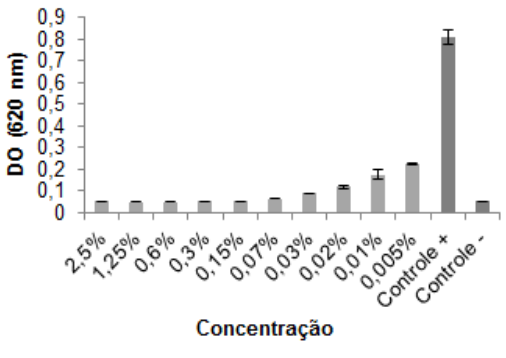
NovaGARD® LM100



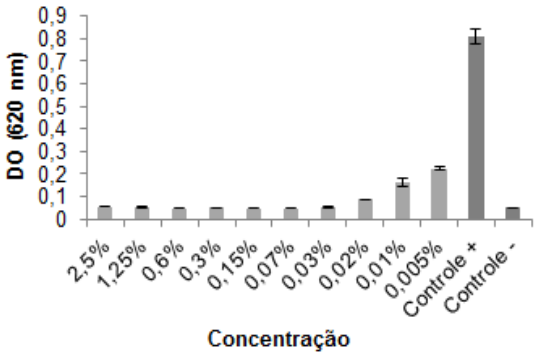
***Blend* 1**



***Blend* 2**

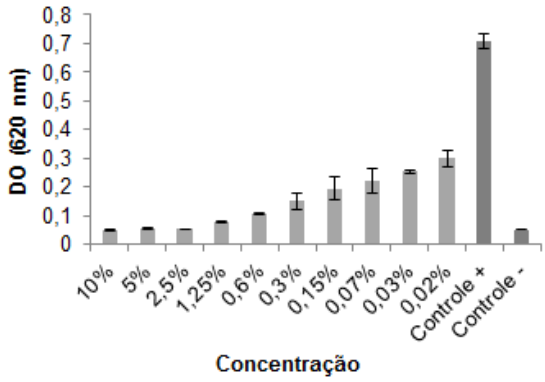


***Blend* 3**

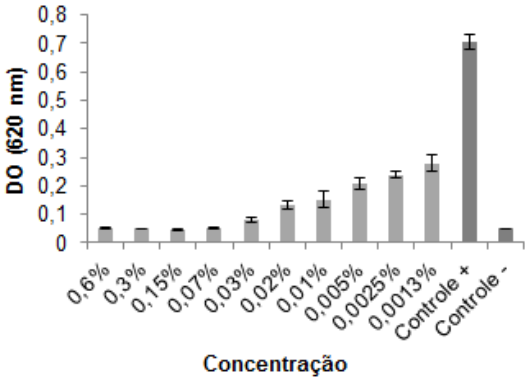


***Blend* 4**

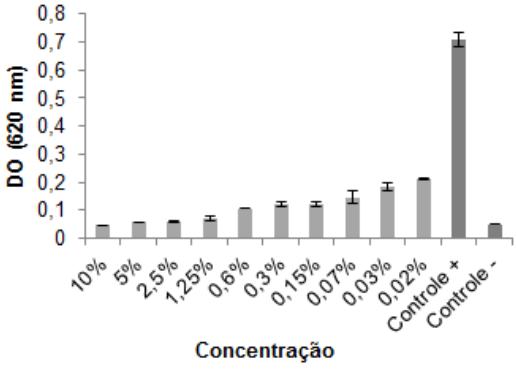
Figura 17. Densidade óptica (620 nm) da cultura de *L. monocytogenes* 595 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados no lote C de mortadela



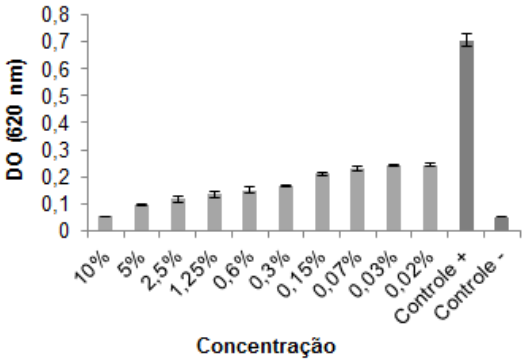
BioVia® CL600



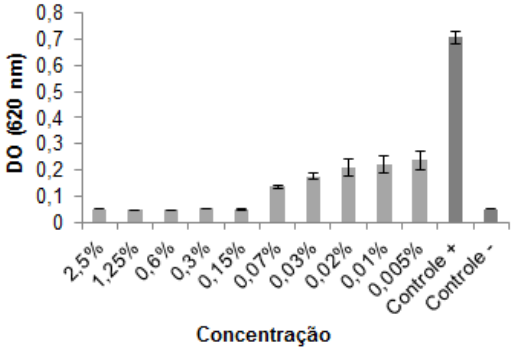
NovaGARD® LM100



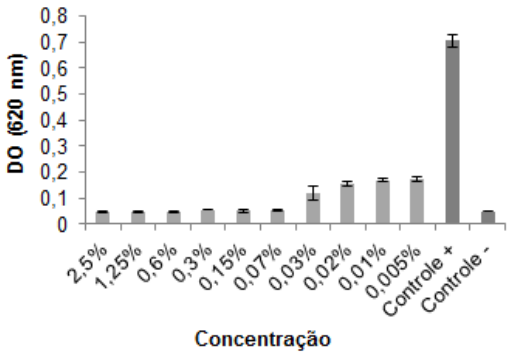
***Blend* 1**



***Blend* 2**

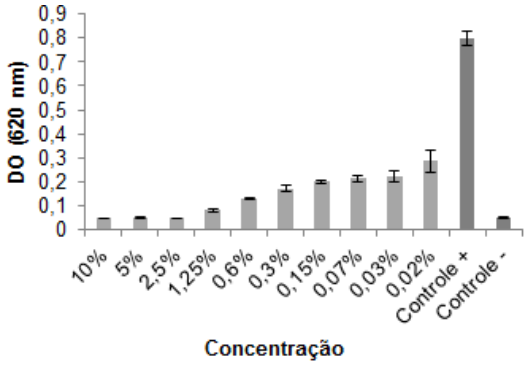


***Blend* 3**

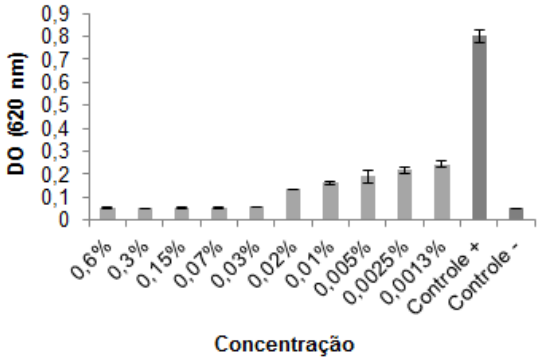


***Blend* 4**

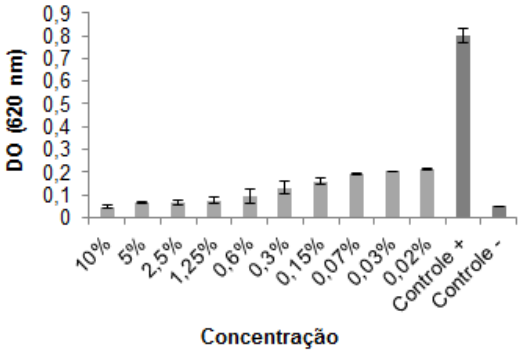
Figura 18. Densidade óptica (620 nm) do *pool* de culturas de *L. monocytogenes* 500, 508 e 595 frente aos produtos comerciais e *blends* utilizados no lote C de mortadela



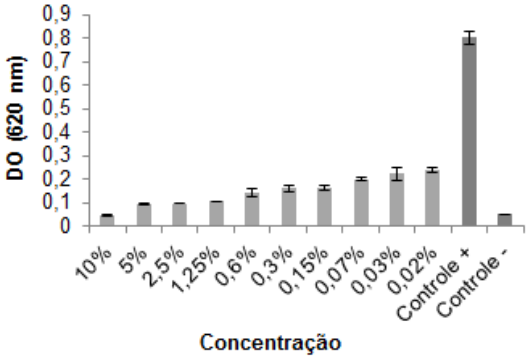
BioVia® CL600



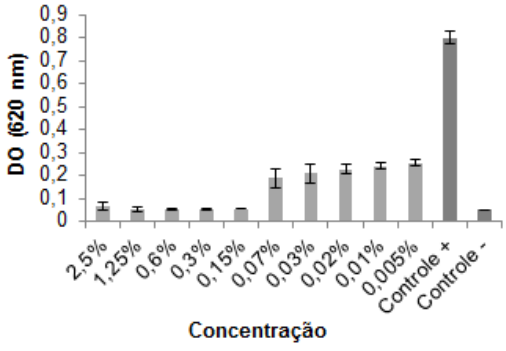
NovaGARD® LM100



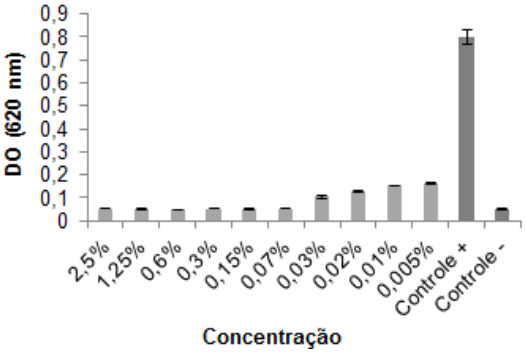
***Blend* 1**



***Blend* 2**



***Blend* 3**



***Blend* 4**

Tabela 9. Valores de CIM dos produtos comerciais e *blends* utilizados no lote C de mortadela frente as cepas *L. monocytogenes* 500, 508 e 595 e o *pool* dessas cepas

Compostos	**500**	**508**	**595**	***Pool***
BioVia® CL600	1,25%	1,25%	1,25%	1,25%
NovaGARD® LM100	0,03%	0,02%	0,03%	0,03%
Blend 1	0,3%	0,15%	5%	5%
Blend 2	0,3%	0,3%	5%	5%
Blend 3	0,07%	0,07%	0,07%	0,07%
Blend 4	0,03%	0,03%	0,03%	0,03%

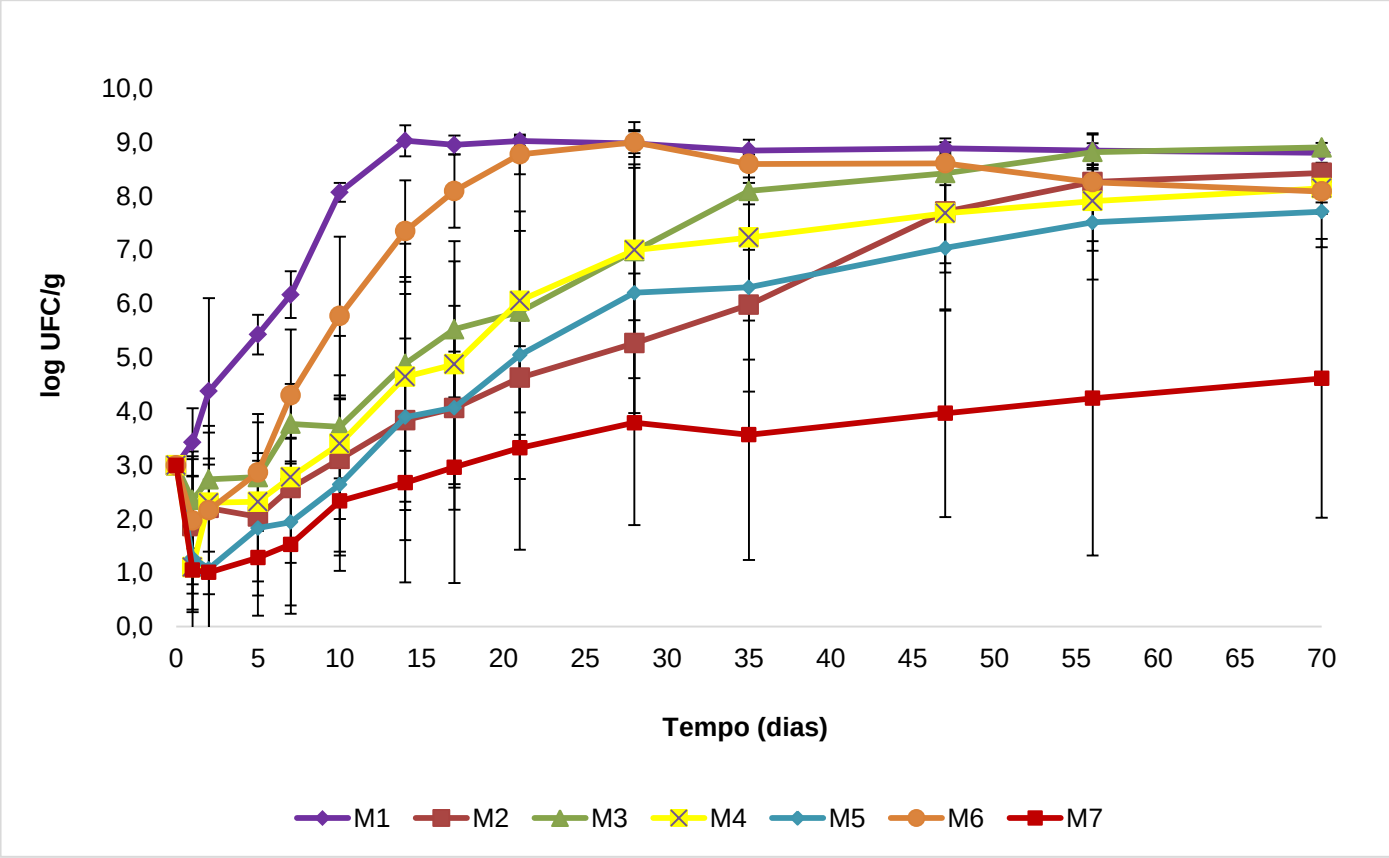
CIM: concentração inibitória mínima

4.3.2. *Atividade antimicrobiana in situ dos produtos comerciais e blends*

Nenhuma das amostras de mortadela dos três lotes fabricados foi positiva para *L. monocytogenes*.

A Figura 19 e Tabela 10 mostram as contagens de *L. monocytogenes* (log UFC/g) nas fatias de mortadela nos três lotes (A, B e C) fabricados, nas sete formulações (M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7), descritas no item 3.4.2, durante armazenamento em refrigeração (8 °C) por 70 dias. Na Tabela 10 estão incluídos os resultados da análise estatística.

Figura 19. Média das contagens (log UFC/g ± DP) de *L. monocytogenes* nos três lotes de mortadela (formulações M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7) durante armazenamento a 8 °C por 70 dias



M1 = lactato de sódio; M2 = BioVia® CL600; M3 = NovaGARD® LM100; M4 = extrato de alecrim + vinagre tamponado + Nisaplin®; M5 = extrato de alecrim + vinagre tamponado + lactato de sódio + Nisaplin®; M6 = extrato de alecrim + lactato de sódio + Nisaplin®; M7 = extrato de alecrim + diacetato de sódio + vinagre tamponado + Nisaplin®.

Tabela 10. Média das contagens (log UFC/g ± DP) de *L. monocytogenes* em três lotes de mortadela (formulações M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7) durante armazenamento a 8 °C por 70 dias

Formulações	Dias													
	0	1	2	5	7	10	14	17	21	28	35	47	56	70
M1*	3.0	$3.4^{a} \pm 0.6$	$4.4^{a} \pm 1.7$	$5.4^{a} \pm 0.4$	$6.2^{a} \pm 0.4$	$8.1^{a} \pm 0.2$	$9.0^{a} \pm 0.3$	$9.0^{a} \pm 0.2$	$9.0^{a} \pm 0.1$	$9.0^{a} \pm 0.2$	$8.9^{a} \pm 0.2$	$8.9^{a} \pm 0.2$	$8.9^{a} \pm 0.3$	$8.8^{a} \pm 0.1$
M2	3.0	$1.9^{ab} \pm 1.3$	$2.2^{b} \pm 0.8$	$2.0^{b} \pm 0.9$	$2.6^{cd} \pm 0.9$	$3.1^{c} \pm 1.1$	$3.8^{c} \pm 1.5$	$4.1^{c} \pm 1.4$	$4.6^{c} \pm 1.1$	$5.3^{b} \pm 1.3$	$6.0^{ab} \pm 1.0$	$7.7^{a} \pm 1.0$	$8.3^{a} \pm 0.3$	$8.4^{a} \pm 0.1$
M3	3.0	$2.4^{ab} \pm 0.9$	$2.7^{ab} \pm 0.4$	$2.8^{b} \pm 0.4$	$3.8^{bc} \pm 0.7$	$3.7^{bc} \pm 1.0$	$4.9^{bc} \pm 1.6$	$5.5^{bc} \pm 1.3$	$5.8^{abc} \pm 2.1$	$7.0^{ab} \pm 1.6$	$8.1^{a} \pm 0.2$	$8.4^{a} \pm 0.6$	$8.8^{a} \pm 0.3$	$8.9^{a} \pm 0.1$
M4	3.0	$1.1^{b} \pm 1.7$	$2.3^{b} \pm 1.3$	$2.3^{b} \pm 1.5$	$2.8^{bcd} \pm 1.6$	$3.4^{bc} \pm 2.0$	$4.6^{bc} \pm 2.5$	$4.9^{c} \pm 2.3$	$6.1^{abc} \pm 2.7$	$7.0^{ab} \pm 2.4$	$7.3^{a} \pm 1.5$	$7.7^{a} \pm 1.1$	$7.9^{a} \pm 0.9$	$8.1^{a} \pm 0.5$
M5	3.0	$1.3^{b} \pm 1.0$	$1.1^{b} \pm 1.7$	$1.8^{b} \pm 1.3$	$1.9^{d} \pm 1.5$	$2.6^{c} \pm 1.6$	$3.9^{c} \pm 2.3$	$4.1^{c} \pm 1.9$	$5.0^{bc} \pm 2.3$	$6.2^{ab} \pm 2.3$	$6.3^{ab} \pm 1.9$	$7.0^{a} \pm 1.2$	$7.5^{ab} \pm 1.1$	$7.7^{a} \pm 0.7$
M6	3.0	$2.0^{ab} \pm 1.2$	$2.2^{b} \pm 1.6$	$2.9^{b} \pm 1.1$	$4.3^{b} \pm 1.2$	$5.7^{ab} \pm 1.5$	$7.4^{ab} \pm 0.9$	$8.1^{ab} \pm 0.7$	$8.8^{ab} \pm 0.4$	$9.0^{a} \pm 0.2$	$8.6^{a} \pm 0.1$	$8.6^{a} \pm 0.2$	$8.3^{a} \pm 0.7$	$8.1^{a} \pm 0.2$
M7	3.0	$1.1^{b} \pm 0.7$	$1.0^{b} \pm 1.1$	$1.3^{b} \pm 1.1$	$1.5^{d} \pm 1.3$	$2.4^{c} \pm 1.0$	$2.7^{c} \pm 1.9$	$3.0^{c} \pm 2.2$	$3.3^{c} \pm 1.9$	$3.8^{b} \pm 1.9$	$3.6^{b} \pm 2.3$	$4.0^{b} \pm 1.0$	$4.2^{b} \pm 2.9$	$4.6^{b} \pm 2.6$

M1 = lactato de sódio; M2 = BioVia® CL600; M3 = NovaGARD® LM100; M4 = extrato de alecrim + vinagre tamponado + Nisaplin®; M5 = extrato de alecrim + vinagre tamponado + lactato de sódio + Nisaplin®; M6 = extrato de alecrim + lactato de sódio + Nisaplin®; M7 = extrato de alecrim + diacetato de sódio + vinagre tamponado + Nisaplin®.

a,b,c,d: médias em uma coluna que não apresentam a mesma letra são significativamente diferentes ($p<0,05$)

Como apresentado na Figura 19 e Tabela 10, foi observado que, com exceção do lactato de sódio (M1), todos os produtos comerciais e *blends* testados apresentaram um efeito imediato nas contagens de *L. monocytogenes*. Após 24 h a 8 °C, houve a redução de 1 a 2 log na contagem de *L. monocytogenes* nas mortadelas com as formulações M2, M4, M5, M6 e M7 ($p<0,05$). Nas mortadelas M3, formuladas com NovaGARD® LM100, a redução foi inferior a 1 log. Nos testes *in vitro* controle, o NovaGARD® LM100 e os *blends* 1, 2, 3 e 4 apresentaram desempenho similar na inibição de *L. monocytogenes* em 24 h.

No 2º dia, as médias das contagens nas mortadelas M2, M3, M4, M5, M6 e M7 permaneceram 2 ou 3 log inferiores às observadas nas mortadelas controle M1. No 7º dia sob refrigeração, as contagens médias de *L. monocytogenes* das amostras controle (M1, com lactato de sódio) passaram dos 3 log UFC/g iniciais para 6,2 ± 0,4 log UFC/g, enquanto nas amostras preparadas com extrato de alecrim + vinagre tamponado + lactato de sódio + Nisaplin® (M5) e extrato de alecrim + diacetato de sódio + vinagre tamponado + Nisaplin® (M7) as contagens continuaram menores do que a contagem inicial (3 log UFC/g).

Observou-se que nas mortadelas M1 as contagens de *L. monocytogenes* no 14º dia em refrigeração atingiram o valor máximo (9 log UFC/g), enquanto nas mortadelas M7, formuladas com o *blend* 4 contendo extrato de alecrim + diacetato de sódio + vinagre tamponado + Nisaplin®, as contagem se mantiveram próximas das contagens iniciais (3 log UFC/g). A análise estatística indicou não haver diferença significativa ($p>0,05$) nas contagens observadas no 14° dia nas mortadelas controle (M1) e naquelas preparadas com o *blend* contendo extrato de alecrim + lactato de sódio + Nisaplin® (M6). Em contrapartida, as contagens de *L. monocytogenes* nas mortadelas M2, M3, M4, M5, M7 no 14° dia não diferiram significativamente entre si ($p>0,05$), mas houve diferença significativa entre as contagens nas mortadelas M1 e M6 ($p<0,05$).

No 28º dia, as contagens de *L. monocytogenes* nas mortadelas M2 e M7 não apresentaram diferença significativa entre si ($p>0,05$), mas foram significantemente menores do que as contagens nas mortadelas M1 e M6 ($p<0,05$). No último dia dos experimentos (70º dia), somente as contagens das mortadelas M7 apresentaram diferença significativa das outras formulações ($p<0,05$).

Os resultados indicam que o *blend* preparado com extrato de alecrim + diacetato de sódio + vinagre tamponado + Nisaplin® (M7) foi o mais efetivo no

controle de *L. monocytogenes* em mortadela durante o armazenamento sob refrigeração. O *blend* contendo extrato de alecrim + lactato de sódio + Nisaplin® (M6) foi o menos efetivo, reduzindo de forma significativa as contagens de *L. monocytogenes* nas mortadelas somente até o 7° dia sob refrigeração ($p<0,05$). Depois de 7 dias, as contagens não se diferenciaram significativamente daquelas observadas nas mortadelas controle (M1) ($p>0,05$).

Comparando os antimicrobianos comerciais BioVia® CL600 (M2) e NovaGARD® LM100 (M3) nas condições de testadas, a Figura 19 sugere que o primeiro é mais efetivo que o segundo, mas as diferenças observadas não foram estatisticamente significantes ($p>0,05$). Contudo, a efetividade desses dois antimicrobianos no controle da multiplicação de *L. monocytogenes* durante o armazenamento sob refrigeração ficou evidente, já que as contagens realizadas em mortadelas preparadas com esses antimicrobianos foram menores do que nas mortadelas controle (M1) até o 28º dia de armazenamento sob refrigeração ($p<0,05$). Quando os *blends* 1 e 2 foram avaliados, sua efetividade no controle de *L. monocytogenes* foi semelhante, sem diferença estatística nos tempos testados. A efetividade dos *blends* 1 e 2 também foi similar à do BioVia® CL600 (M2) e NovaGARD® LM100 (M3).

Esses resultados indicam que os todos novos *blends* empregados para o preparo das mortadelas M4 e M5 apresentam desempenho semelhante no controle de multiplicação de *L. monocytogenes* nas mortadelas armazenadas a 8 °C, que também foi similar ao apresentado pelos antimicrobianos comerciais BioVia® CL600 (M2) e NovaGARD® LM100 (M3). O *blend* 4 (extrato de alecrim, diacetato de sódio, vinagre tamponado e Nisaplin®) utilizado no preparo da mortadela M7 foi o mais efetivo, apresentando melhor desempenho do que os *blends* 1 e 2. Em contrapartida, o *blend* 3 (extrato de alecrim + lactato de sódio + Nisaplin®) foi o menos efetivo de todos os antimicrobianos testados, diferentemente do que foi observado nos testes *in vitro*, em que esse *blend* apresentou eficácia no controle *in vitro* das cepas de *L. monocytogenes*. Porém, isso pode ser explicado considerando que nos testes *in vitro* só foi observado o efeito inibitório em 24 h. Nesse período, os resultados foram semelhantes aos obtidos nas análises do tempo 1 das mortadelas M6, preparadas com o *blend* 4.

Considerando os componentes dos *blends* estudados, é possível concluir que o diacetato de sódio teve um papel importante na atividade antilisteria, já que esse

ingrediente é o que distingue o *blend* 4 dos demais. O efeito do diacetato de sódio já havia sido demonstrado no estudo de Mbandi & Shelef (2002), que relataram um decréscimo de 5 log UFC/g nas contagens médias de *L. monocytogenes* em mortadelas preparadas com 0,2% deste sal, armazenadas por 45 dias a 5 °C, quando comparadas com mortadelas controle, sem adição de antimicrobianos.

Adicionalmente, o vinagre tamponado também pode ser considerado um ingrediente chave, já que o *blend* que não continha esse composto (*blend* 3) foi o menos efetivo no controle de crescimento de *L. monocytogenes* em mortadelas durante o armazenamento a 8 °C.

Estudos realizados em produtos cárneos prontos para consumo corroboram com a eficácia do vinagre como ingrediente bacteriostático para *L. monocytogenes*. Porto-Fett *et al.* (2015) observaram redução de 1,1 e 2,0 log UFC/fatia nas contagens desse microrganismo em presunto fatiado formulado com 2% e 2,5% de vinagre tamponado, respectivamente, por um período de 90 dias a 4 °C. Lavieri *et al.* (2014) reportaram que 1% de vinagre tamponado na composição de produtos como presunto e salsicha frankfurt curados foi capaz de controlar a multiplicação de *L. monocytogenes* por 14 semanas à 4 °C. O estudo de Badvela *et al.* (2016) relatou resultados ainda melhores, ao mostrar que vinagre tamponado a 0,6% e 0,8% controlou o crescimento de *L. monocytogenes* por 12 semanas em fatias de peito de peru não curado mantidas refrigeradas. Em outro estudo, Porto-Fett *et al.* (2018) analisaram o efeito antilisteria de vinagre tamponado líquido ou seco em mortadelas suínas fatiadas, embaladas à vácuo e armazenadas sob temperatura de 4 ou 12 °C, e concluíram que as contagens médias de *L. monocytogenes* foram mais altas nas amostras armazenadas em temperatura mais elevada, além de ocorrerem em menor tempo quando comparadas com o armazenamento a 4 °C, mostrando que a temperatura influencia na multiplicação de *L. monocytogenes*. Além disso, também foi observado que vinagre tamponado líquido 1% e 1,5% e vinagre tamponado seco a 1% podem contribuir no controle de *L. monocytogenes* em mortadelas armazenadas por 120 dias a 4 °C, porém, vinagre seco a 0,6% levou a um crescimento de 0,8 log UFC/fatia nas mesmas condições de armazenamento. Essa concentração de vinagre tamponado foi a mesma utilizada no presente estudo, mas a combinação com outros compostos antimicrobianos favoreceu a sua atividade antilisteria.

A nisina é uma bacteriocina sabidamente ativa frente a cepas patogênicas isoladas de ambiente de processamento de carnes, com efeito sobre a formação de biofilmes. Vários estudos reportaram os efeitos bacteriostáticos de nisina frente à *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo, testada isoladamente ou em combinação com outros compostos antimicrobianos. Samelis *et al.* (2005) avaliaram por 120 dias o crescimento de *L. monocytogenes* em fatias de mortadela suína curada, previamente imersa por 1 min em uma solução com Nisaplin® (Aplin & Barrett Ltd., Inglaterra) ou diacetato de sódio e embaladas a vácuo e mantidas a 4 °C por 120 dias, observando uma redução de 1,0-1,5 log UFC/cm^2 no dia 0 e manutenção do efeito antilisteria durante 10 dias de armazenamento. Nos tratamentos com nisina (0,5 g/100 mL) combinada com diacetato de sódio (3 g/100 mL), esse efeito se prolongou por 90 dias. As mortadelas controle, sem imersão em antimicrobianos, apresentaram contagens de 6-7 log UFC/cm^2 no dia 20, sendo que as amostras tratadas com nisina alcançaram essa contagem somente no 50° dia de armazenamento.

Também Lourenço *et al.* (2017) estudaram a ação inibitória de Nisaplin® (0,5 g/kg, DuPont™ Danisco®, EUA) sobre *L. monocytogenes* em queijos espanhóis não fermentados armazenados a 4 °C durante 21 dias. Foi observada uma queda inicial de 2,9 log UFC/g em relação às contagens nos queijos controle, e com diferença de 3-4 logs UFC/g nos queijos preparados com nisina em relação aos queijos sem adição de antimicrobianos, que apresentaram contagens de 8 log UFC/g.

Brasileiro *et al.* (2016) avaliaram a inibição de *L. monocytogenes* em mortadelas formuladas com o antimicrobiano comercial NovaGARD® LM100 (extrato de alecrim + diacetato de sódio + nisina encapsulada + nisina livre), NovaGARD® NR100 (extrato de alecrim + nisina livre) e lactato de sódio (Purasal® S) durante 30 dias em armazenamento sob refrigeração (8 °C). Os autores também avaliaram mortadelas preparadas com os componentes individuais do composto comercial NovaGARD® LM100 (extrato de alecrim, diacetato de sódio, nisina encapsulada e nisina livre) e observou que esses compostos não demonstraram diferença no crescimento de *L. monocytogenes*, em comparação com as amostras controle (sem antimicrobiano). Em contrapartida, a nisina livre, em concentração recomendada pelo Mercosul (12,5 ppm), apresentou uma redução na contagem de *L. monocytogenes* até o 10º dia de armazenamento a 8 °C, sendo que essa redução foi de 3-4 logs UFC/g no 5º dia. Ou seja, a nisina foi imprescindível na mistura de

antimicrobianos para controlar o crescimento de *L. monocytogenes* em mortadelas. Em concordância com os resultados do presente estudo, outros resultados obtidos por Brasileiro *et al.* (2016) mostraram que, em comparação com as mortadelas controle (sem adição de antimicrobianos), houve uma redução de 3 logs UFC/g na contagem dos microrganismos até o 10° dia de armazenamento. O antimicrobiano comercial NovaGARD® NR100, que se diferencia do *blend* 3 utilizado no presente estudo (extrato de alecrim + lactato de sódio + Nisaplin®) apenas pela ausência de lactato de sódio, não apresentou diferença na inibição de *L. monocytogenes* em comparação com as mortadelas controle (sem antimicrobiano) ($p>0.05$). O mesmo pôde ser observado em relação às mortadelas controle, preparadas com lactato de sódio (Purasal® S) ($p>0.05$). Além disso, as contagens nestas mortadelas apresentaram um aumento de 5 logs UFC/g em 10 dias, mantendo-se dessa forma até 30 dias de armazenamento, indicando que o lactato de sódio na formulação das mortadelas não tem efeito na inibição de *L. monocytogenes*.

Segundo Liu *et al.* (2017), os microrganismos apresentam diferentes respostas a nível molecular quando em contato com sais orgânicos. Os autores mostraram que *L. monocytogenes*, quando exposta à ação de lactato de sódio, expressa genes relacionados à reparação de DNA e divisão celular, afetando a estrutura celular. O microrganismo é capaz de se adaptar ao stress no período de 24 h e voltar a se multiplicar. Outro estudo (SUO *et al.*, 2018) mostrou que a presença de lactato de sódio em produtos cárneos prontos para consumo pode causar a expressão de genes de virulência em *L. monocytogenes,* como *act*A*, hly, iap, inl*A*, inl*E*, mpl, plc*A e *plc*B, presentes também nas cepas utilizadas no presente estudo. Por outro lado, Pieta *et al.* (2017) mostraram que óleos essenciais extraídos de plantas podem inibir a expressão de genes de virulência de *L. monocytogenes*. São, portanto, necessários mais estudos para avaliar o efeito do lactato de sódio sobre a expressão de genes de resistência e virulência em *L. monocytogenes*.

Além do uso de antimicrobianos, o armazenamento sob refrigeração de produtos cárneos prontos para consumo também é um fator importante a ser considerado na tentativa de controlar a multiplicação de *L. monocytogenes*. ZHANG *et al.* (2012) analisaram a multiplicação desse microrganismo em amostras de peito de peru, rosbife e presunto tratados, ou não, com lactato de sódio e diacetato de sódio, em diferentes temperaturas de armazenamento (4, 7 e 10 °C), observando que o microrganismo cresceu mais rapidamente nas amostras que não continham

antimicrobianos e sob temperatura de 10 °C. Também, mesmo nas amostras sem antimicrobianos, foi observado um aumento da fase lag de *L. monocytogenes*, diretamente proporcional à diminuição da temperatura. Além disso, a sensibilidade microbiana pode ser influenciada pelas características dos alimentos como teor de gordura, proteína, pH, sal e outros aditivos, bem como propriedades extrínsecas: temperatura e embalagem à vácuo (BURT, 2004). As condições de armazenamento como temperatura de 8 °C e embalagem à vácuo, utilizadas neste estudo, contribuíram na redução das contagens médias de *L. monocytogenes* nos primeiros dias de armazenamento.

5. CONCLUSÃO

Os compostos extrato de alecrim, diacetato de sódio e Nisaplin®, testados *in vitro* e separadamente, apresentaram maior eficiência na inibição de *L. monocytogenes* que os demais compostos avaliados. Mesmo em concentrações reduzidas, os produtos comerciais BioVia® CL600 e NovaGARD® LM100 e os *blends* 1, 2, 3 e 4 utilizados no preparo das mortadelas foram efetivos na inibição de *L. monocytogenes* quando testados *in vitro*.

De acordo com os testes *in situ*, concluiu-se que o melhor controle de *L. monocytogenes* em mortadelas durante 70 dias a 8 °C ocorreu nos produtos preparados com o *blend* 4, contendo extrato de alecrim, diacetato de sódio, vinagre tamponado e Nisaplin®. O *blend* 3, contendo extrato de alecrim, lactato de sódio e Nisaplin®, foi o menos efetivo entre os *blends* testados, o que sugere que o vinagre tamponado e o diacetato de sódio são compostos com melhor capacidade de inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* em mortadelas.

.

6. REFERÊNCIAS

ALAHAKOON, A.U.; JAYASENA, D.D.; RAMACHANDRA, S.; JO, C. Alternatives to nitrite in processed meat: up to date. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 1, p. 37-49, 2015.

BADVELA, M.K., DICKSON, J.S., SEBRANEK, J.G., SCHROEDER, W.D. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by buffered dry vinegar in reduced-sodium ready-to-eat uncured turkey stored at 4 °C. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 8, p. 1396–1403, 2016.

BARBOSA, S.M.; TODOROV, S.D.; IVANOVA, I.; CHOBERT, J.M.; HAERTLÉ, T.; FRANCO, B.D.G.M. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. **Food Microbiology**, v. 46, p. 254-262, 2015.

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

BEDIE, G.K.; SAMELIS, J.; SOFOS, J.N.; BELK, K.E.; SCANGA, J.A.; SMITH, G.C. Antimicrobials in the formulation to control *Listeria monocytogenes* postprocessing contamination on frankfurters stored at 4 degrees C in vacuum packages. **Journal of Food Protection**, v. 64, n.12, p. 1949-1955, 2001.

BINGÖL, E.B; BOSTAN, K. Effect of sodium lactate on the microbiological quality and shelf life of sausages. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Science***,* v. 31, n.5, p. 333–339, 2007.

BISCOLA, V.; TODOROV, S.D.; CAPUANO, V.S.C.; ABRIOUEL, H.; GÁLVEZ, A.; FRANCO, B.D.G.M. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. **Meat Science**, v. 93, p. 607–613, 2012.

BRASIL. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Consulta Pública nº 60, 26 de julho de 2000**. Disponível em: http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[3160-1-0].PDF. Acesso em: 02/09/2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos.** Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=4344. Acesso em: 19/08/2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa nº 51, de 29 de dezembro de 2006. **Adota o Regulamento Técnico de Atribuição de Aditivos, e seus Limites das Categorias de Alimentos que especifica**. Disponível em http://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-51-2006_76049.html. Acesso em: 01/09/2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. 2013. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf. Acesso em: 06/09/2018.

BRASILEIRO, I.S.; BARBOSA, M.; IGARASHI, M.C.; BISCOLA, V.; MAFFEI, D.F.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. Use of growth inhibitors for control of *Listeria monocytogenes* in heat-processed ready-to-eat meat products simulating post-processing contamination. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 7-13, 2016.

BREUKINK, E.; WIEDEMANN, I.; KRAAJI, C.V.; KUIPERS, O.P.; SAHL, H.G.; KRUIJFF, B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore forming peptide antibiotic. **Science**, v. 286, p. 2361-2364, 1999.

BUCHANAN, R.L.; GOLDEN, M.H.; WHITING, R.C. Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 6, p. 474-478, 1993.

BUCHANAN, E.; GORRIS, L.G.M.; HAYMAN, M.M.; JACKSON, T.C.; WHITING, R. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, v. 75, p. 1-13, 2017.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n.1, p. 223-253, 2004.

CAMARGO, A.C.; PAULA, O.A.L.; TODOROV, S.D.; NERO, L.A. *In vitro* evaluation of bacteriocins activity against *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 1239-1251, 2016.

CHAITIEMWONG, M.; HAZELEGER, W.C.; BEUMER, R.R.; ZWITERING, M.H. Quantification of transfer of *Listeria monocytogenes* between cooked ham and slicing machine surfaces. **Food Control**, v. 44, p. 117-184, 2014.

CHIKINDAS, M.L.; WEEKS, R.; DRIDER, D.; CHISTYAKOV, V.A. Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 23-28, 2018.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**, M07-A6, ed. 6, v. 23, n. 2, 2003.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**, M07-A10, ed. 10, v. 35, n. 2, 2015.

CODEX ALIMENTARIUS. **Food Additives Detail, Nisin 234**. 2018. Disponível em: http://www.fao.org/gsfaonline/additives/details.html?id=1. Acesso em: 05/09/2018.

CONNER, H.A., ALLGEIER, R.J. Vinegar: its history and development. **Advances in Applied Microbiology**, v. 20, p. 81–133, 1976.

DESAI, M.A.; KURVE, V.; SMITH, B.S.; CAMPANO, S.G.; SONI, K.; SCHILLING, M.W. Utilization of buffered vinegar to increase the shelf life of chicken retail cuts packaged in carbon dioxide. **Poultry Science**, v. 93, p. 1–5, 2014.

DOOLAEGE, E.H.A.; VOSSEN, E.; RAES, K.; MEULENAER, B.; VERHÉ, R.; PAELINCK, H.; SMET, S. Effect of rosemary extract dose on lipid oxidation, colour stability and antioxidant concentrations, in reduced nitrite liver pâtés. **Meat Science**, v. 90, n. 4, p. 925-931, 2012.

DUPONT. **NovaGARD Antimicrobial blends**. Disponível em: http://www.danisco.com/product-range/antimicrobials/novagard-antimicrobial-blends/. Acesso: 10/09/2018.

EFSA. Europian Food Safety Authority. **Safety of nisin (E234) as food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use**. 2017. Disponível em: https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.5063 . Acesso em: 05/09/2018.

ENDRIKAT , S.; GALLAGHER, D.; POUILLOT, R.; QUESENBERRY, H.H.; LABARRE, D.; SCHROEDER, C.M.; KAUSE, J. A comparative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in prepackaged versus retailsliced deli meat. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 612-619, 2010.

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

FERNANDES, R.P.P.; TRINDADES, M.A.; TONIN, F.G.; LIMA, C.G.; PUGINE, S.M.P.; MUNEKATA, P.E.S.; LORENZO, J.M.; MELO, M.P. Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n.1, p. 451-460, 2016.

FERREIRA, V.; WIEDMANN, M.; TEIXEIRA, P.; STASIEWICZ, M.J. Listeria monocytogenes persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 1, p. 150–170, 2014.

FSANZ. Food Standards Australia New Zeland. **Use of nisin processed meat products**. 2007. Disponível em: http://www.foodstandards.gov.au/code/applications/documents/A565_FAR_Nisin_FINAL.pdf. Acesso em: 05/09/2018.

GHABRAIE, M.;VU, K.D.; TATA, L.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. **Food Science and Technology**, v. 66, p. 332-339, 2016.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M.; CHORIANOPOULO, N.; LANGSRUD, S.; MORETRO, T.; HABIMANA, M.; DESVAUX, M.; RENIER, S.; NYCHAS, G.J. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**, v. 97, p. 298–309, 2014.

GRAU, F.H.; VANDERLINDE, P.B. Occurrence, numbers, and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 1, p. 4-7, 1992.

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

HOLEY, R.A.; PATEL, D.; Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 273-292, 2005.

HORITA, C.N.; BAPTISTA, R.C.; CATURLA, M.Y.R.; LORENZO, J.M.; BARBA, F.J.; SANT'ANA, A.S. Combining reformulation, active packaging and non-thermal post-packaging decontamination technologies to increase the microbiological quality and safety of cooked ready-to-eat meat products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 72, p. 45-61, 2018.

HWANG, C.A.; TAMPLIN, M.L. Modeling the lag phase and growth rate of *Listeria monocytogenes* in ground ham containing sodium lactate and sodium diacetate at various storage temperatures. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 7, p. 246-253, 2007.

IULIETTO, M.F.; SECHI, P.; BORGOGNI, E.; CENCI-GOGA, B.T. Meat spoilage: a critical review of a neglected alteration due to ropy slime producing bacteria. **Italian Journal of Animal Science**, v. 14, p. 316-326, 2015.

JORDAN, K.; MCAULIFFE, O. ***Listeria monocytogenes* in foods**. In: TOLDRÁ, F. Advances in Food and Nutrition Research. Cambridge: Academic Press, v. 81, p. 181–213, 2018.

KONDROTIENE, K.; KASNAUSKYTE, N.; SERNIENE, L.; GÖLZ, G.; ALTER, T.; KASKONIENE, V.; MARUSKA, A.S.; MALAKAUSKAS, M.; Characterization and application of newly isolated nisin producing *Lactococcus lactis* strains for control of *Listeria monocytogenes* growth in fresh cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 507-514, 2018.

LAVIERI, N.A.; SEBRANEK, J.G.; BREHM-STECHER, B.F.; CORDRAY, J.C.; DICKSON, J.S.; HORSCH, A.M.; JUNG, S.; LARSON, E.M.; MANU, D.K.; MENDONÇA, A.F. Investigating the control of *Listeria monocytogenes* on alternatively-cured frankfurters using natural antimicrobial ingredients or post-lethality interventions. **Meat Science**, v. 97, p. 568–574, 2014.

LIN, L.; HU, J.Y.; WU, Y.; CHEN, M.; OU, J.; YAN, L. Assessment of the inhibitory effects of sodium nitrite, nisin, potassium sorbate, and sodium lactate on *Staphylococcus aureus* growth and staphylococcal enterotoxin A production in cooked pork sausage using a predictive growth model. **Food Science and Human Wellness**, v. 7, n. 1, p. 83-90, 2018.

LIU, X.; BASU, U.; MILLER, P.; MCMULLEN, L.M. Differential genes expression and filamentation of *Listeria monocytogenes* 08-5923 exposed to sodium lactate and sodium diacetate. **Food Microbiology**, v. 63, p.153-158, 2017.

LORENZO, J.M.; PATEIO, M.; DOMINGUEZ, R.; BARBA, F.J.; PUTNIK, P.; KOVACEVIC, D.B.; SHPIGELMAN, A.; GRANATO, D.; FRANCO, D. Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. **Food Research International**, v. 106, p. 1095-1104, 2018.

LOURENÇO, A.; KAMNETZ, M.B.; GADOTTI, C.; DIEZ-GONZALES, F. Antimicrobial treatments to control *Listeria monocytogenes* in queso fresco. **Food Microbiology**, v. 64, p. 47-55, 2017.

LUCERA, A.; COSTA, C.; CONTE, C.; DEL NOBILE, M.A. Food applications of natural antimicrobial compounds. **Frontiers in Microbiology**, v.3., n. 287, p.1-12, 2012.

MBANDI, E.; SHELEF, L.A. Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in meat by combinations of sodium lactate and diacetate. **Journal of Food Protection**, v.64, n. 5, p. 640–644, 2001.

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**, v. 76, n. 3, p. 191-198, 2002.

MCDONNELL, L.M.; GLASS, K.A.; SINDELAR, J.J. Identifying ingredients that delay outgrowth of *Listeria monocytogenes* in natural, organic, and clean-label ready-to-eat meat and poultry products. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 1366–1376, 2013.

MELERO, B.; STESSL, B.; MANSO, B.; WAGNER, M.; ESTEBAN-CARBONERO, O.J.; HERNÁNDEZ, M.; ROVIRA, J.; RODRIGUEZ-LÁZARO, D. *Listeria monocytogenes* colonization in a newly established dairy processing facility. **International Journal of Food Microbiology**, v. 289, n. 16, p. 64-71, 2019.

MENA, P.; CIRLINI, M.; TASSOTTI, M.; HERRLINGER, K.A.; DALL'ASTA, C.; RIO, D.D. Phytochemical profiling of flavonoids, phenolic acids, terpenoids, and volatile fraction of a rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) extract. **Molecules**, v. 21, p. 1-15, 2016.

MERCOSUL. **Regulamento técnico Mercosul sobre incorporação de aditivos na lista geral harmonizada de aditivos, na lista geral harmonizada de corantes e na lista de aditivos alimentares com suas classes funcionais**. GMC/Resolução nº 38/01. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/PDF/GMC_RES_2001-038.pdf. Acesso em: 04/09/2018.

MOHAMMADZADEH-AGHDASH, H.; SOHRABI, Y.; MOHAMMADI, A.; SHANEHBANDI, D.; DEHGHAN, P.; DOLATABADI, J.E.N. Safety assessment of sodium acetate, sodium diacetate and potassium sorbate food additives. **Food Chemistry**, v. 257, p. 211-215, 2018.

MOREY, A.; BOWERS, J.W.; BAUERMEISTER, L.J.; SINGH, M.; HUANG, T.S.; MCKEE, S.R. Effect of salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, shelf life, meat quality, and consumer acceptability of beef frankfurters. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 1, p. 54-60, 2014.

NACMCF. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. Parameters for determining inoculated pack/challenge study protocols. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 1, p. 140-202, 2010.

NIKMARAM, N.; BUDARAJU, S.; BARBA, F.J.; LORENZO, J.M.; COX, R.B.; MALLIKARJUNAN, K.; ROOHINEJAD, S. Application of plant extracts to improve the shelf-life, nutritional and health-related properties of ready-to-eat meat products. **Meat Science**, v. 145, p. 245-255, 2018.

OLIVEIRA, T.L.C.; RAMOS, A.L.S.; RAMOS, E.M.; PICCOLI, R.H.; CRISTIANINIA, M. Natural antimicrobials as additional hurdles to preservation of foods by high pressure processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 60-85, 2015.

PERUMALLA, A.V.S.; HETTIARACHCHY, N.S.; OVER, K.F.; RICKE, S.C.; GBUR, E.E.; ZHANG, J.; DAVIS, B. Effect of potassium lactate and sodium diacetate combination to inhibit *Listeria monocytogenes* in low and high fat chicken and turkey hotdog model systems. **The Open Food Science Journal**, v. 6, p.16-23, 2012.

PESAVENTO, G.; CALONICO, C.; BILIA, A.R.; BARNABEI, M.; CALESINI, F.; ADDONA, R.; MENCARELLI, L.; CARMAGNINI, L.; DI MARTINO, M.C.; LO NOSTRO, A. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, v. 54, p. 188-199, 2015.

PIETA, L.; ESCUDERO, F.L.G.; JACOBUS, A.P.; CHEIRAN, K.P.; GROSS, J.; MOYA, M.L.E.; SOARES, G.L.G.; MARGIS, R.; FRAZZON, A.P.G.; FRAZZON, J. Comparative transcriptomic analysis of *Listeria monocytogenes* reveals upregulation of stress genes and downregulation of virulence genes in response to essential oil extracted from *Baccharis psiadioides*. **Annals of Microbiology**, v. 67, n.7, p. 479-490, 2017.

PONRAJAN, A.; HARRISON, M.A.; PRINGLE, T.D.; SEGRES, J.R.; LOWE, B.L.; MCKEITH, R.O.; STELZLENI, A.M. Effect of sodium citrate plus sodium diacetate or buffered vinegar on quality attributes of enhanced beef top sirloins. **Meat Science**, v. 91, n. 1, p. 43-49, 2012.

PORTO-FETT, A.C.S.; CAMPANO, S.G.; SHOYER, B.A.; SARAH, W.; LUCHANSKY, J.B. Viability of *Listeria monocytogenes* on uncured turkey breast commercially prepared with and without buffered vinegar during extended storage at 4 and 10 °C. **Journal of Food Protection**, n. 6, p. 872-1042, 2014.

PORTO-FETT, A.C.S.; CAMPANO, S.G.; SHOYER, B.A.; LUCHANSKY, J.B. Efficacy of buffered vinegar and potassium lactate for controlling *Listeria monocytogenes* associated with commercially prepared, deli-style ham and roast beef during extended storage at 4 °C. **Meat Science**, v. 101, p. 150–151, 2015.

PORTO-FETT, A.C.S.; CAMPANO, S.G.; RIEKER, M.; LUCHANSKY, J.B. Behavior of *Listeria monocytogenes* on mortadella formulated using a natural, clean-label antimicrobial agent during extend storage at 4 or 12 °C. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 5, p. 769-775, 2018.

PRADHAN, A.K.; IVANEK, R.; GRÖHN, Y.T.; GEORNARAS, I.; SOFOS, J.N.; WIEDMANN, M. Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in selected

categories of deli meats: impact of lactate and diacetate on listeriosis cases and deaths. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 5, p. 978-989, 2009.

REUNANEN, J.; SARIS, P.E.J. Bioassay for nisin in sausage; a shelf life study of nisin in cooked sausage. **Meat Science**, v. 66, n. 3, p. 515–8, 2004.

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

SAUDERS, B.D.M.; SANCHEZ, D.; RICE, D.H.; CORBY, J.; STICH, S.; FORTES, E.D.; ROOF, S.E.; WIEDMANN, M. Prevalence and molecular diversity of *Listeria monocytogenes* in retail establishments. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 11, p. 2337-2349, 2009.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.; ANGULO, F.; TAUXE, R.; WIDDOWSON, M.; ROY, S.; JONES, J.; GRIFFIN, P. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 7–15, 2011.

SHELEF, L.A. Antimicrobials effects of lactates: a review. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 445-450, 1994.

SHI, H.; TRINH, Q.; XU, W.; LUO, Y.; TIAN, W.; HUANG, K. The transcriptional response of virulence genes in *Listeria monocytogenes* during inactivation by nisin. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 519-524, 2013.

SHIN, J.M.; GWAK, J.W.; KAMARAJAN, P.; FENNO, J.C.; RICKARD, A.H.; KAPILA, Y.L. Biomedical applications of nisin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 6, p. 1449-1465, 2016.

SILVA, R.X.A; CAMPOS, K.F.; FRANCO, J.R.M.; SILVA, T.J.P. Lactato de sódio, nisina e sua combinação na validade comercial da linguiça toscana embalada a vácuo e estocada a 4 °C. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 746-751, 2014.

STELZLENI, A.M.; PONRAJAN, A.; HARRISON, M.A. Effects of buffered vinegar and sodium dodecyl sulfate plus levulinic acid on *Salmonella typhimurium* survival, shelf-life, and sensory characteristics of ground beef patties. **Meat Science**, v. 95, n. 1, p. 1-7, 2013.

SUO, Y.; GAO, S.; BARANZONI, G.M.; XIE, Y.; LIU, Y. Comparative transcriptome RNA-Seq analysis of *Listeria monocytogenes* with sodium lactate adaptation. **Food Control**, v. 91, p. 193-201, 2018.

SWAMY, M.K.; AKHTAR, M.S.; SINNIAH, U.R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. Evidence-based. **Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-21, 2016.

THAKUR, M.; ASRANI, R.K.; PATIAL, V. **Listeria monocytogenes: a food-born pathogen**. In: HOLBAN, A.M.; GRUMEZESCU, A.M. Foodborn Diseases. Academic Press, v. 15, p. 157-192, 2018.

USDA. U.S. Department of Agriculture. **Economic burden of major foodborne illnesses acquired in the United States**. 2015. Disponível em:

https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/43984/52807_eib140.pdf?v=0. Acesso em: 01/09/2018.

USDA/FSIS. U.S. Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. **The interagency retail *Listeria monocytogenes* risk assessment workgroup**. 2015. Disponível em: http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/c0c6dfbc-ad83-47c1-bcb8-8db6583f762b/Lm-Retail-Technical-Report.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 18/09/2018.

USFDA (U.S. Food and Drugs Administration). **Food additives for use in meat and poultry products: sodium diacetate, sodium acetate, sodium lactate and potassium lactate**. 2000. Disponível em: http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/99-028DF.htm. Acesso em: 23/08/2018.

USFDA (U.S. Food and Drugs Administration). **Direct food substances affirmed as GRAS**. 2018. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=184. Acesso em: 23/08/2018.

WIEDEMANN, I.; BREUKINK, E.; KRAAJI, C.V.; KUIPERS, O.P.; BIERBAUM, G.; KRUIJFF, B. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 1772-1779, 2001.

ZHANG, L.; MOOSEKIAN, S.R.; TODD, C.E.; RYSER, E.T. Crescimento de *Listeria monocytogenes* em diferentes carnes de charcutaria de varejo durante armazenamento domiciliar simulado. **Journal of Food Protection**, v. 75 n. 5, p. 896-905, 2012.

ZILELIDOU, E.A.; SKANDAMIS, P.N. Growth, detection and virulence of *Listeria monocytogenes* in the presence of other microorganisms: microbial interactions from species to strain level. **International Journal of Food Microbiology**, v. 277, n. 20, p. 10-25, 2018.