

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**CONTROLE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* SCOTT A EM QUEIJO MINAS
FRESCAL ATRAVÉS DE TRATAMENTO TERMOQUÍMICO**

MARIA APARECIDA DE SOUZA VIEIRA
BIÓLOGA

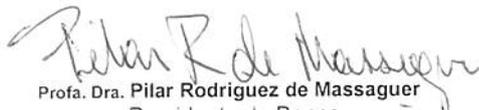
Orientadora: Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Maria Aparecida de Souza Vieira, aprovada pela Comissão Julgadora em 06 de dezembro de 2000.

**Tese apresentada à Faculdade
de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do grau de doutora
em Ciência de Alimentos**

Campinas, 06 de dezembro de 2000


Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer
Presidente da Banca

Campinas - SP

2000

i



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	B.C.
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	V673C
V.	Ex.
TOMBO BC/	43482
PROC.	16-392101
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/04/04
N.º CPD	

CM-00153979-3

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

V673c Vieira, Maria Aparecida de Souza
Controle de *Listeria Monocytogenes* Scott A em queijo minas frescal através de tratamento termoquímico / Maria Aparecida de Souza Vieira. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Pilar Rodriguez de Massaguer
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Nisina. 3. Termoquímica – Tratamento. 4. Queijo minas. I. Massaguer, Pilar Rodriguez. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Pilar R de Massaguer

Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer
(orientadora)

Mariza Landgraf

Profa. Dra. Mariza Landgraf
(membro)

José Santo Goldoni

Prof. Dr. José Santo Goldoni
(membro)

Walkiria H. Viotto

Prof. Dra. Walkiria Hanada Viotto
(membro)

Prof. Dra. Mirna Lúcia Gigante
(membro)

José Luiz Pereira

Prof. Dr. José Luiz Pereira
(suplente)

Prof. Dr. Marcelo Cristianini
(suplente)

**Com gratidão e com carinho, dedico este trabalho a meu marido Luiz Gonzaga
e a minhas filhas Flávia e Glenda pela compreensão
por períodos tão prolongados de ausência, pelo estímulo para que esse trabalho fosse
concluído, por abrirem mão do tempo que
lhes era devido, dedicando-me seu carinho, o seu tempo e o melhor que poderiam
oferecer**

**Dedico também a memória de meus pais Oswaldo e Anna Aparecida
por tudo que fizeram por mim**

AGRADECIMENTOS

A DEUS

A Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer pelo acompanhamento constante, durante o desenvolvimento deste trabalho e também pelo empenho, para que nada faltasse durante o seu andamento.

A CAPES pela bolsa concedida e pelo auxílio semestral para aquisição de material de consumo.

A Banca Examinadora, que tão atenciosamente, pelo conhecimento e sugestões compartilhados empenharam-se na correção da tese, sou grata.

A Firma Applin Barrett Ltda. agradeço pela gentileza de ceder nisina, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho, em especial ao Dr. Joss Delves-Broughton e a Nancy Harumi Ohata Santana (B.V. representações) pelo acompanhamento e sugestões.

Ao Departamento de Ciência de Alimentos (UNICAMP) pelas oportunidades oferecidas durante o curso.

Aos professores da Faculdade de Engenharia de Alimentos pelo estímulo e ajuda profissional ou pessoal, em especial ao Prof. Dr. Nelson Horácio Pezoa García.

Aos pesquisadores Dr. José Luiz Pereira, Norma Teruko Miya, Dr. Arnaldo Yoshiteru kuaye, Dirce Yorika Kabuti, Maria Elizabete Fernandez Dias e em especial ao Dr. Salvador Massaguer Roig, e ao Dr. José Carvalho sou grata, pela ajuda e empréstimo de equipamentos, durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Dra. Maria Tereza Destro pelo incentivo, pela amizade e pelas sugestões.

Aos funcionários da Biblioteca: Creusa K. Nomura, Cláudia Aparecida R. Souza, Geraldo Aparecido da Silva, José Carlos Marcondes e Antonio Carlos Gonçalves (“*in memoriun*”) e também ao funcionário da Secretaria de Pós-Graduação Cosme Perota pela receptibilidade e prontidão no atendimento.

Aos amigos do Laboratório de Termobacteriologia: Luciana Taba Nagazato, Homero Ferracini Gumerato, Flávio Baglione, Denise Aparecida Delgado, Flávio Luís Schmith, Celso Duarte, Luciane Cristina Mendes, Juliane Gonçalves, Augusto Favero, Izael Gressoni Junior, Leandro Francisco do Carmo, André Garcia, Milton Massahiro Atarassi e em especial a Rosa Maria Tosello pela colaboração e incentivo.

Aos amigos do laboratório de Higiene de Alimentos: Aláise Gil Guimarães, Raquel Manhani, Grasiela Pestana de Castro, Maria Helena C. R. Passos, Ana Lúcia Penteadó, Jacinta R. O. Franco pelo apoio e pelos momentos de felicidade.

A Patrícia Blumer Zacarchenco pelo empenho, boa vontade e perda de muitas horas de descanso, para possibilitar a chegada do leite, indispensável, para realização da parte experimental dessa tese.

A todos os amigos e colegas da UNICAMP e em especial a Erna V. Jong, Verônica Lobato, Renata Torrezan, Ana Maria de Oliveira, Maria Cristina Bressan, Martha Z. Miranda, por todo carinho, ajuda e pelos bons momentos de convivência.

A minha família pela paciência, apoio e compreensão dessa “escolha pessoal” e da distância decorrente dessa escolha, sou grata.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMO	viii
SUMMARY.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Taxonomia e características gerais do gênero <i>Listeria</i>	4
2.1.1 Taxonomia	4
2.1.2 Características gerais.....	5
2.2. Ocorrência na natureza.....	6
2.3. <i>Listeria monocytogenes</i> em humanos	9
2.4. <i>Listeria monocytogenes</i> em animais	11
2.5 <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos	12
2.5.1. Ocorrência da <i>Listeria monocytogenes</i> em laticínios.....	12
2.6. Fatores que afetam a termorresistência, sobrevivência e multiplicação de <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos.....	19
2.6.1. Outros fatores extrínsecos que afetam o crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i>	27
2.7. Métodos de detecção, identificação e enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i>	37
2.8. Nisina como agente antimicrobiano.....	50
2.8.1. Definição, composição química e característica.....	50
2.8.2. Ação da nisina.....	52

2.8.3. Fatores que afetam a atividade da nisina.....	56
2.8.4. Nisina em alimentos.....	58
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	70
3.1. Materiais.....	70
3.1.1 Reagentes e meio de cultura.....	70
3.1.2 Amostras.....	70
3.1.3 Microrganismos.....	70
3.1.4 Nisina.....	71
3.1.5. Utensílios.....	71
3.2. Métodos.....	72
3.2.1. Avaliação da contaminação dos queijos Minas frescal comercializados.....	72
3.2.1.1. Amostragem.....	72
3.2.1.2. Metodologia para detecção, isolamento e identificação de <i>Listeria</i> spp. em queijo.....	72
3.2.1.3. Metodologia para enumeração de <i>Listeria</i> spp. em queijos.....	73
3.2.2. Avaliação de meios de cultura para enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A não injuriada e termicamente injuriada.....	75
3.2.2.1. Preparo dos inóculos.....	75
3.2.2.2. Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A.....	76
3.2.3. Determinação da curva de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A em meio não seletivo.....	76
3.2.3.1. Preparo do inóculo.....	76
3.2.3.2. Curva de crescimento.....	77
3.2.4. Determinação da resistência ao calor e ao tratamento conjugado calor-nisina em leite integral estéril.....	78
3.2.4.1. Técnica de preparo do inóculo.....	78
3.2.4.2. Resistência térmica.....	78
3.2.4.3. Análise estatística.....	79

3.2.5. Validação do tratamento termoquímico em leite , para a fabricação de queijos Minas frescal.....	82
3.2.5.1. Caracterização físico-química do leite cru e de queijos.....	82
3.2.5.1.1. Determinação da acidez titulável	82
3.2.5.1.2. Determinação do pH.....	82
3.2.5.1.3. Determinação da densidade	83
3.2.5.1.4. Determinação do teor de gordura.....	83
3.2.5.2. Caracterização microbiológica do leite cru e dos queijos.....	83
3.2.5.2.1. Detecção e enumeração de <i>Listeria</i> spp.....	83
3.2.5.2.2. Detecção de <i>Salmonella</i> e enumeração <i>Staphylococcus aureus</i>	83
3.2.5.2.3. Detecção e quantificação de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	83
3.2.5.3. Preparo do inóculo de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A.....	84
3.2.5.4. Preparo dos queijos	84
3.2.5.5. Avaliação do tratamento empregado no processamento dos queijos Minas frescal.....	86
3.2.5.6. Sanificação de utensílios.....	86
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
4.1. Avaliação da contaminação dos queijos Minas frescal comercializados	88
4.2. Avaliação de meios de cultura para enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A não injuriada e termicamente injuriada.....	94
4.3. Determinação da curva de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A em meio não seletivo.....	97
4.4. Determinação da resistência ao calor e ao tratamento conjugado calor-nisina em leite integral estéril.....	99
4.5. Aplicação do tratamento termoquímico em queijos Minas frescal.....	109
4.5.1. Análise do leite cru.....	109
4.5.2. Análise dos queijos processados.....	111
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	122

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
7. APÊNDICE.....	154

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Plano experimental fracional tipo central composto ortogonal.....	81
TABELA 2. Diferentes tratamentos no leite destinado a manufatura dos queijos Minas frescal.....	85
TABELA 3. Procedência dos isolados obtidos de amostras de queijos Minas frescal com as características morfológicas e de colônia de <i>Listeria</i> spp.....	90
TABELA 4. Identificação bioquímica de <i>Listeria</i> spp. isoladas de amostras de 20 queijos Minas frescal comercializados, na região de Campinas (SP)	91
TABELA 5. Microrganismos isolados de amostras de 20 queijos Minas frescal comercializados na região de Campinas.(SP)	91
TABELA 6. Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> (UFC/grama) em amostras de queijos Minas frescal em meio MOX.....	92
TABELA 7. Enumeração de células não injuriadas de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A (UFC/ml), intencionalmente inoculadas em leite desnatado estéril, em diferentes meios de cultivo.....	95
TABELA 8. Enumeração de células termicamente injuriadas (56°C/20 minutos) de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A (UFC/ml), intencionalmente inoculadas em leite desnatado estéril, em diferente meios de cultura.....	95
TABELA 9. Desenho experimental para combinação de diferentes condições: concentração de nisina, temperatura e resposta (Valor D) para <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A.....	101
TABELA 10. Comparação dos valores D preditos para <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A pelo modelo e os valores observados experimentalmente	104

TABELA 11. Caminho dos mínimos estimados para a variável resposta valor D (segundos) de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A.....	107
TABELA 12. Caracterização físico-química do leite cru utilizado nos processamentos dos queijos Minas frescal.....	109
TABELA 13. Análises microbiológicas do leite cru utilizado nos diferentes processamentos dos queijos Minas frescal.....	110
TABELA 14. Valores de pH, acidez titulável (% de ácido láctico) e de gordura durante a vida de prateleira das amostras de queijos Minas frescal, fabricados com adição de 10 ⁵ UFC de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A por ml de leite utilizado (Lote 1).....	112
TABELA 15. Valores de pH, acidez titulável (% de ácido láctico) e de gordura durante a vida de prateleira das amostras de queijos Minas frescal, contendo 10 ⁵ UFC de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A e 26,4 UI de nisina por ml de leite utilizado (Lote 1).	112
TABELA 16. Valores de pH, acidez titulável (% de ácido láctico) e de gordura (%) durante a vida de prateleira das amostras de queijos Minas frescal, contendo 26,4 UI de nisina por ml de leite utilizado (Lote 2).....	113
TABELA 17. Valores de pH, acidez titulável (% de ácido láctico) e de gordura (%) durante a vida de prateleira das amostras de queijos Minas frescal, sem adição no leite de nisina e de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A (Lote 3).	113
TABELA 18. Análise microbiológica dos queijos Minas frescal, durante sua vida de prateleira, fabricados com adição de 10 ⁵ UFC de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A por ml de leite utilizado (Lote 1).....	114

TABELA 19. Análise microbiológica dos queijos Minas frescal, durante sua vida de prateleira, adicionados de 10^5 UFC de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott a e 26,4 UI de nisina por ml de leite utilizado (Lote 1).....	114
TABELA 20. Análise microbiológica das amostras dos queijos Minas frescal, durante sua vida de prateleira, contendo 26,4UI de nisina por ml de leite utilizado (Lote 2).....	117
TABELA 21. Análise microbiológica dos queijos Minas frescal, durante sua vida de prateleira, sem adição de nisina e de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A (Lote 3).....	115

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Rotas de transmissão de <i>Listeria monocytogenes</i> ao homem	8
FIGURA 2. Estrutura da nisina.....	51
FIGURA 3. Inibição do entumescimento pré-emergente de esporos pela nisina.	56
FIGURA 4. Fluxograma da metodologia de detecção, isolamento e identificação de <i>Listeria</i> spp.....	74
FIGURA 5. Curva de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A em meio não seletivo (TSB-YE) à 35°C.....	99
FIGURA 6. Fração de sobreviventes (<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A) versus tempo (segundos) para os diversos tratamentos do plano experimental.....	105
FIGURA 7. Superfície de Resposta utilizando os valores D (segundos) obtidos para <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, em leite integral estéril, com as variáveis concentração de nisina (UI/ml) e temperatura. (°C).....	106

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de otimizar os parâmetros, concentração de nisina (UI/ml), temperatura e tempo de tratamento térmico, para a efetiva redução de *Listeria monocytogenes* Scott A em leite integral, destinado a manufatura de queijos Minas frescal. Em uma primeira etapa, para verificar a incidência de *Listeria* spp. em queijos Minas frescal, foram analisadas 20 amostras de queijos obtidos de diversos estabelecimentos comerciais da região de Campinas (SP) utilizando a metodologia descrita por WARBURTON et al. (1992). Das amostras estudadas 25% estavam contaminadas com *L. monocytogenes*, 40% com *L. innocua*, 20% com *Listeria welshimeri* e 5% com *L. seeligeri*. Subseqüentemente, utilizando tubos capilares, foram realizados 16 experimentos para verificar a resistência termoquímica de *Listeria monocytogenes* Scott A (10^5 UFC/ml) em leite integral estéril. Para isto, foi seguido um delineamento estatístico de Superfície de Resposta, com o intuito de estudar o efeito das variáveis, concentração de nisina (UI/ml) e tratamento térmico. A partir dos dados obtidos foi possível elaborar um modelo matemático, que foi validado através de outro experimento. Neste caso, o tratamento aplicado (temperatura=64,4°C e nisina=26,4 UI/ml) foi selecionado dentre os valores mínimos estimados para D. O tempo de 2,34 segundos correspondeu a redução de 9D (D64,4°C por 2,34 segundos). Finalmente, 16 queijos Minas frescal foram fabricados empregando-se 4 diferentes tratamentos: 1) leite inoculado com *L. monocytogenes* Scott A (10^5 UI/ml); 2) leite inoculado como descrito anteriormente, e adicionado de nisina (26,4UI/ml); 3) leite não inoculado, com adição de 26,4 UI/ml de nisina e 4) tratamento controle, em que nem nisina e nem *L. monocytogenes* Scott A foram acrescentadas no leite. A temperatura de 64,4°C e o tempo de 2,34 segundos foram utilizados durante o tratamento térmico do leite. Os queijos foram mantidos sob refrigeração à 7°C e analisados durante intervalos após os tempos de 1, 7, 14 e 21 dias de vida de prateleira, para verificar a presença de *Listeria* spp., *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e coliformes. O tratamento térmico de 64,4°C por 2,34 segundos aplicado ao leite, não foi eficiente para eliminar *L. monocytogenes* (inoculada), *Staphylococcus aureus* e coliformes totais originalmente presentes no leite. O tratamento somente eliminou coliformes fecais já existentes no leite.

No entanto, quando a nisina (26,4UI/ml) foi adicionada ao leite como coadjuvante térmico, nenhum microrganismo foi detectado nos queijos durante os 21 dias de armazenamento à 7°C. *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e fecais foram controlados durante a fabricação e vida de prateleira dos queijos Minas frescal, devido a ação efetiva da nisina, associadas com a temperatura e tempo de pasteurização (64,4°C por 2,34 segundos), concentração de NaCl (0,6%) e temperatura de armazenamento (7°C). Um polinômio de segunda ordem foi desenvolvido para prever com exatidão o decréscimo da resistência de *Listeria monocytogenes* Scott A em função de temperatura e concentração de nisina, dentro do espaço experimental desenhado.

SUMMARY

The purpose of this study was to optimize the parameter, nisin concentration (IU/ml) temperature and time to eliminate *Listeria monocytogenes* Scott A from whole milk used in Minas frescal white cheese manufacture. In a first experiment, the incidence of *Listeria* spp. in 20 samples of Minas frescal white cheese, obtained from different places in the region of Campinas (SP), was evaluated by the methodology described by Warburton et al. (1992). This analysis showed that 25% of the samples were positive for *L. monocytogenes*, 40% for *L. innocua*, 20% for *L. welshimeri* and 5% for *L. seeligeri*. Subsequently, a second set of experiments was carried out to verify the thermo-chemical resistance of *L. monocytogenes* Scott A (10^5 CFU/ml). A total of 16 experiments were performed to study the effects of nisin concentration (IU/ml) and temperature ($^{\circ}$ C) using sterile whole milk and capillary tubes. By using Response Surface Methodology experimental design, a mathematical model able to predicted the optimum temperature and nisin concentration to reduce the D value of this microorganism was obtained. Based on this data, the temperature of $64,4^{\circ}$ C and nisin concentration of 26,4 IU/ml were chosen to validate de model in another experiment. According to this mathematical model, a reduction of 9D ($D_{64,4^{\circ}\text{C}} = 2,34$ seconds) is achieved at this temperature and nisin concentration. Finally, Minas frescal cheeses were manufactured using four treatments: 1) the milk used to produce the cheeses was inoculated with *L. monocytogenes* Scott A (10^5 CFU/ml); 2) milk was inoculated as described plus nisin (26,4 IU/ml); 3) only nisin at 26,4 IU/ml was added to the milk; 4) no nisin neither *L. monocytogenes* were added to milk. In all four treatments, the temperature of $64,4^{\circ}$ C was applied for 2,34 seconds during milk thermal treatment. After manufacturing, the cheeses were maintained under refrigeration (7° C) and were analyzed at 1, 7, 14 and 21 days of storage to verify the presence of *Listeria* spp., *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and coliforms. The thermal treatment ($64,4^{\circ}$ C for 2,34 seconds) applied to milk was not efficient to eliminate *L. monocytogenes* (inoculated), *S. aureus* and total coliforms present in milk. This treatment was only able to eliminate fecal coliforms originally present in the raw milk. On the other hand, when the thermal adjuvant nisin (26,4 IU/ml) was added to the milk, no

microorganisms were detected in the cheeses during 21 days of shelf life (7°C). During manufacturing and storage period of the Minas frescal cheeses, control of *L. monocytogenes*, *S. aureus*, total and fecal coliforms was achieved due to the effective action of nisin together with additional hurdles such as temperature and pasteurization time (64,4/2,34 seconds), NaCl concentration (0,6%) and refrigeration store temperature (7°C). A second order polynomial equation was developed to predict the reduction of *Listeria monocytogenes* Scott A resistance as a function of nisin concentration and temperature within the experimental conditions tested.

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes foi detectada pela primeira vez em 1891 (WEHR, 1987). No entanto, somente nos últimos anos foi reconhecida como um microrganismo patogênico, transmitido por alimentos, tornando-se uma importante fonte de preocupação das indústrias alimentícias, devido ao seu comprovado papel em listeriose.

Os surtos causados pela *Listeria monocytogenes* tem sua origem na ingestão de alimentos comprovadamente contaminados. Entre os surtos documentados encontram-se o ocorrido em Boston no ano de 1979, relacionado a vegetais (alface, aipo e tomates) perfazendo um total de 23 casos e 5 mortes (DILLON & PATEL, 1992); no ano de 1981 na cidade Nova Scotia, Canadá, o alimento envolvido foi salada de chucrute, deixando como resultado 41 casos e entre eles 18 mortes (URL et al., 1993; DILLON & PATEL, 1992 e BUSCH & DONNELLY, 1992); já em 1983, em Massachussets, a ocorrência dessa bactéria em leite pasteurizado resultou em 14 mortes dos 49 casos existentes (DILLON & PATEL, 1992; URL et al., 1993; BUSH & DONNELLY, 1992 e HOF & ROCOURT, 1992); na Califórnia, em 1985, a ocorrência de 142 casos envolvendo 48 mortes esteve relacionada com o consumo de queijo estilo mexicano (DILLON & PATEL, 1992; URL et al., 1993; BUSH & DONNELLY, 1992 e HOF & ROCOURT, 1992); na França, em 1993, o alimento incriminado foi língua de porco, tendo como resultado 279 casos e 63 mortes (GOULET et al. apud McCLURE et al., 1997) e em 1995, neste mesmo país, 17 pessoas desenvolveram listeriose, com 2 mortes, devido ao consumo dos queijos Brie de Meaux fabricados com leite não pasteurizado (ANONYMOUS, 1995 apud KINDERLERER et al., 1996). Nos Estados Unidos, a ocorrência da listeriose envolve anualmente cerca de 1800 casos, resultando em aproximadamente, 22,22% fatais (BALOGA & HARLANDER, 1991 e HAYES et al., 1992). Segundo WENGER et al. (1990), a maioria das listerioses ocorre esporadicamente e os casos detectados, parecem não estarem relacionados.

Dados sobre a incidência de *Listeria spp.* em alimentos no Brasil ainda são escassos, visto que grande parte dos laboratórios normalmente não se preocupam com a detecção desta bactéria e, a legislação brasileira não apresenta nenhuma cláusula de obrigatoriedade para detectar e/ou proibir sua presença em produtos comercializados, com exceção de queijos. Entretanto, em outros países inúmeros trabalhos tem sido publicados sobre a incidência de *Listeria* em alimentos, sendo os produtos de laticínios e os carnes os mais pesquisados.

A listeriose humana afeta principalmente a mulher grávida e seu feto, pessoas idosas, recém nascidos e sobretudo indivíduos imunodeprimidos, que são mais susceptíveis às manifestações severas desta doença. *Listeria monocytogenes* pode causar meningites ou meningoencefalites, frequentemente associadas a septicemia, infecções, abortos, partos prematuros, etc.

Nos alimentos, esse microrganismo é capaz de crescer e sobreviver em condições adversas que inibem a maioria dos outros microrganismos patogênicos. Crescem em ampla faixa de pH, apresentando uma temperatura ótima de crescimento que varia de 30 a 37°C (NOLAN et al., 1992 e RYSER & MARTH, 1991a).

Sendo a *Listeria* pertencente ao grupo dos patógenos emergentes, existe uma série de métodos para a identificação e classificação desse microrganismo. Os procedimentos normalmente utilizados com esta finalidade envolvem a incubação em meio enriquecido e em meio com ágar por 48 horas, seguido por uma série de testes confirmativos bioquímicos e morfológicos .

Atualmente, vários estudos têm sido dirigidos às substâncias conhecidas como bacteriocinas. Essas, atuam como inibidores do crescimento de muitos microrganismos patogênicos, prevenindo ou reduzindo a deterioração dos alimentos e aumentando sua vida de prateleira. Entre as bacteriocinas utilizadas, destaca-se a nisina por se apresentar eficaz e

segura à saúde dos indivíduos, sendo considerada pelo FDA como um produto “Generally Recognized as Safe ”(GRAS).

Diferentes tipos de alimentos podem apresentar *Listeria monocytogenes*. No entanto, os produtos de laticínios e, mais recentemente, os derivados de carnes estão envolvidos em casos de listeriose.

Desse modo, os objetivos do presente trabalho foram:

- a) avaliar o grau de contaminação de *Listeria* spp. em queijos Minas frescal comercializados na região de Campinas (SP);
- b) determinar um tratamento conjugado de pasteurização e concentração de nisina que minimizasse a resistência térmica de *Listeria monocytogenes* Scott A, em termos de valores D, em leite integral estéril.
- c) Elaborar um modelo matemático para prever com exatidão as condições de temperatura(°C), concentração de nisina (UI/ml) e tempo que melhor reduzisse o número de *Listeria monocytogenes* Scott A em queijos Minas frescal e validar o modelo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Taxonomia e características gerais do gênero *Listeria*

2.1.1. Taxonomia

Embora dados da literatura datados dos anos 1891 (França) e 1893 (Inglaterra) tivessem apresentado indícios de infecções causadas por *Listeria*, este microrganismo foi somente descrito pela primeira vez por MURRAY et al. (1926), quando os mesmos verificaram a presença de *Listeria monocytogenes*, denominada na época de *Bacterium monocytogenes*, em fígado de coelhos e em cobaias doentes (GRAY & KILLINGER, 1966; FARBER & PETERKIN, 1991 e DONNELLY et al., 1992). Em 1927, PIRIE ao isolar uma bactéria idêntica em fígado de roedores (“African jumping mouse”) passou a denominá-la de *Listerella hypatolytica* e em 1940, este mesmo pesquisador, atribuiu um novo nome a este microrganismo, o qual passou a chamar de *Listeria monocytogenes* (GRAY & KILLINGER, 1966 e PIRIE, 1927 apud DONNELLY et al., 1992).

De acordo com FARBER & PETERKIN (1991), *Listeria monocytogenes* ficou sendo a única espécie reconhecida dentro do gênero até 1961. Outras espécies como *Listeria denitrificans*, *Listeria grayi*, *Listeria murrayi*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii* e *Listeria innocua* passaram a fazer parte do gênero em 1961, 1966, 1971, 1983, 1983, 1984 e 1984, respectivamente. Atualmente, a posição taxonômica, levando em conta a homologia DNA/DNA e a seqüência de resultados de 16S RNA ribossômico, demonstrou que o gênero compõe-se de seis espécies a saber: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii* (subsp. *ivanovii* e subsp. *londoniensis*), *Listeria welshimeri* e *Listeria grayi* (ROCOURT, 1994).

Dentre as espécies conhecidas no momento, apenas a *Listeria monocytogenes* e a *Listeria ivanovii* são consideradas patogênicas ao homem e aos animais quando presentes em alimentos. Neste sentido, a primeira se destaca por ser considerada um problema de saúde pública, atingindo tanto o homem como também os animais enquanto, a segunda somente é patogênica para os animais, causando abortos em bovinos e caprinos (SEELIGER & JONES, 1986 e PEREIRA & ROCOURT, 1993).

2.1.2. Características gerais

Segundo o Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey (1994), as espécies de *Listeria* são caracterizadas como bastonetes curtos, tendo como dimensões 0,4 a 0,5 μm de diâmetro por 0,5 a 2,0 μm de comprimento, com extremidades arredondadas, podendo ocorrer isoladas, em cadeias curtas ou ainda menos frequentemente, as células podem estar dispostas em filamentos longos. Estes microrganismos são aeróbios ou anaeróbios facultativos, Gram-positivos, móveis (locomoção através de flagelos peritríquios, quando cultivados a 20-25°C), não esporulados e não capsulados (HOLT et al., 1994).

Esses organismos, considerados psicotolerantes, podem multiplicar-se em uma ampla faixa de temperatura (3 a 45°C), apresentando seu crescimento ótimo variando entre 30 e 37°C, possibilitando desta forma que alimentos contaminados apresentem um número maior de microrganismos, mesmo quando armazenados à temperatura de refrigeração (RYSER & MARTH, 1991a; DONNELLY et al., 1992 e HOLT et al., 1994). O pH de crescimento varia entre 5,0 e 9,6, mas também podem ocorrer extrapolações desta faixa, quando outros fatores que atuam no crescimento estão envolvidos (DONNELLY et al., 1992). Deste modo, GEORGE et al. (1988) afirmaram que pode ocorrer também crescimento em pH com valores 4,39 e 4,62 em caldo nutriente, em temperaturas de 20 a 30°C e 10 a 7°C, respectivamente. Os mesmos podem crescer em meio contendo até 10% de cloreto de sódio

e sobreviver na presença de 25,5% de sal a 4°C (SEELIGER & JONES, 1986; McCLURE et al., 1989 e MITSCHERLICH & MARTH, 1884 apud DONNELLY et al., 1992).

Quando estas bactérias são cultivadas em ágar nutriente, após um período de 24 a 48 horas, apresentam colônias com diâmetro de 0,5 a 1,5 mm. Quando submetidas a iluminação normal apresentam uma coloração cinza azulada e quando visualizadas a luz transmitida, em direção oblíqua, são de cor azul esverdeadas (SEELIGER & JONES, 1986 e HOLT et al., 1994). Em meio para observar a motilidade, o crescimento desses organismos apresenta-se em forma de guarda-chuva, onde a zona de crescimento máximo ocorre de 3 a 5 mm abaixo da superfície, quando cultivados a 25°C (SEELIGER & JONES, 1986 e DONNELLY et al., 1992). Em placas contendo ágar-sangue algumas espécies produzem β-hemólise (formação de zonas claras), característica que está associada a sua patogenicidade (FARBER & PETERKIN, 1991).

Em testes bioquímicos as espécies deste gênero apresentam-se positivas para catalase, vermelho de metila, Voges Proskauer, hidrólise da esculina e do hipurato de sódio enquanto que, as reações negativas são obtidas para oxidase, H₂S, indol, uréia, liquefação da gelatina e hidrólise da caseína (SEELIGER & JONES, 1986 e DONNELLY et al., 1992). Com respeito a fermentação de carboidratos, a utilização dos mesmos varia entre as espécies de *Listeria*. No entanto, todas as espécies fermentam a glicose sem a produção de gás (PINE et al., 1989 e DONNELLY et al., 1992).

2.2. Ocorrência na natureza

Listeria monocytogenes encontra-se amplamente distribuída na natureza e tem sido isolada do solo (WELSHIMER & DONKER-VOET, 1971; WEIS & SEELIGER, 1975; FENLON et al., 1999), da água (WATKINS & SLEATH, 1981; DIJKSTRA, 1982; SERAFINI et al., 1996), do esgoto (WATKINS & SLEATH, 1981, AL-GHAZALI & AL-AZAWI, 1988; FENLON et al., 1999), de plantas (WELSHIMER & DONKER-VOET,

1971; FENLON et al., 1996; FENLON et al., 1999), de fezes (NAGI & VERMA, 1967, SKOVGAARD & NORRUNG, 1989; SKOVGAARD & MORGEN, 1988; FENLON, 1996; FENLON et al.,1999), de animais de fazenda (GILL, 1931; CARTER et al., 1976; REBHUM & DELAHUNTA, 1982 e BUNNING et al. 1986), de aves (GRAY, 1958; GRAY & KILLINGER, 1966) e de peixes, crustáceos e mariscos (GRAY & KILLIGER, 1966; EKLUND, 1995; ERISSON et al.,1996).

De acordo com WELSHIMER & DONKER-VOET (apud DONNELLY et al., 1992), a *Listeria* existe em ambiente saprofítico, envolvendo plantas e solo, que servem como reservatório para transmissão de infecção ao animal e ao homem. Este último por sua vez, pode entrar em contato com esse microrganismo não somente através de plantas e solo, como já mencionado, mas também através de outras fontes como animais, carne, leite e produtos de laticínios, frutos do mar, fezes e do próprio semelhante (RYSER & MARTH, 1991c) (Figura 1).

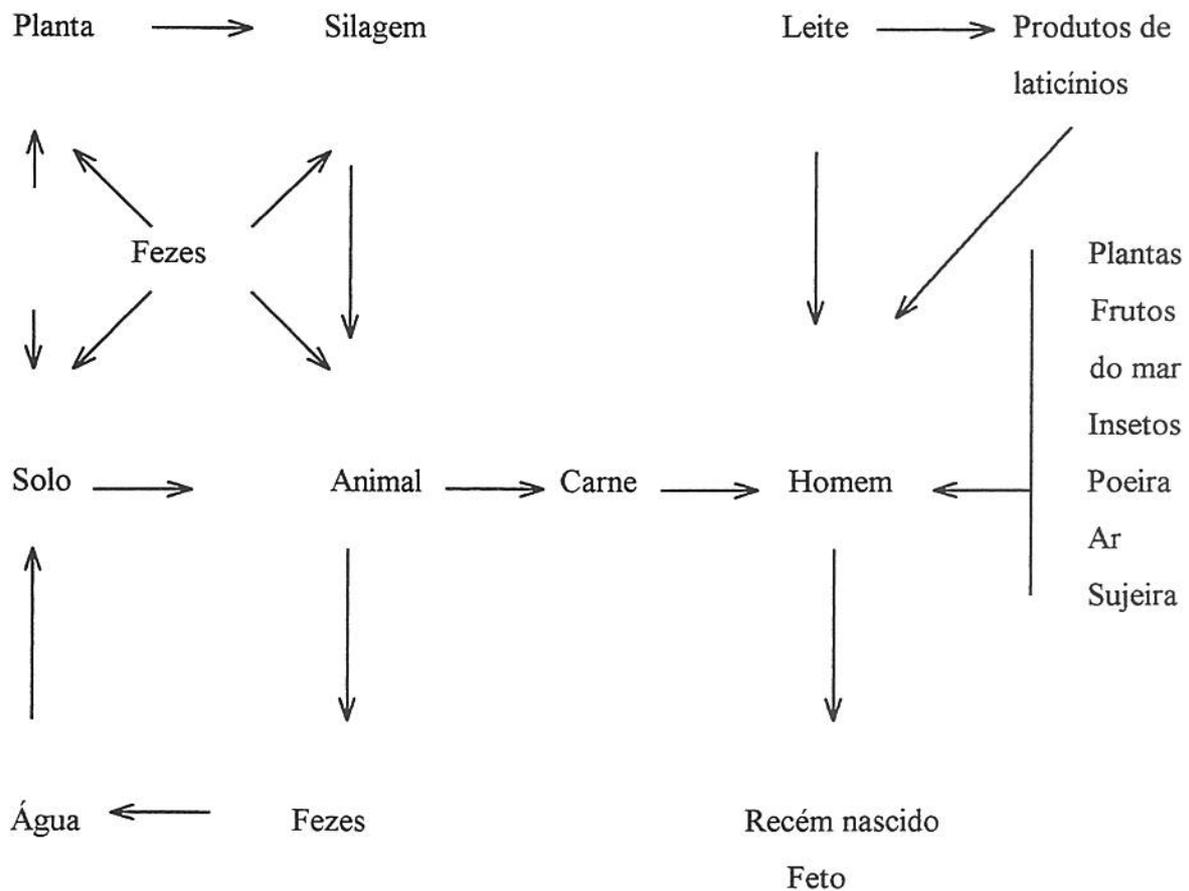


Figura 1. Rotas de transmissão de *Listeria monocytogenes* ao homem

Fonte: RYSER & MARTH (1991c)

Este microrganismo, também tem sido isolado em diferentes indústrias, incluindo as de leite e de carne, sendo também detectado nos efluentes dos abatedouros e das usinas processadoras de aves (DESTRO, 1990).

2.3. *Listeria monocytogenes* em humanos

Apesar de diversos relatos sobre doenças indicarem que a listeriose humana já existia há muitos anos, foi somente em 1929 que a *Listeria monocytogenes* foi isolada, pela primeira vez, por Nyfeldt, de sangue de três pacientes (RYSER & MARTH, 1991d). Nos anos subsequentes, em consequência de baixíssima incidência de casos, essa doença recebeu muito pouca atenção. Após 1980, em decorrência de surtos de listerioses registrados, a *Listeria monocytogenes* foi reconhecida como um importante microrganismo patogênico, despertando assim interesse de profissionais, tanto da área médica como também, da área de pesquisa.

Sob circunstâncias normais, qualquer pessoa pode ser infectada pela *Listeria monocytogenes* porém, muitas delas permanecem assintomáticas, indicando que alguns indivíduos possuem resistência à infecção causada por essa bactéria. Testes laboratoriais realizados em animais indicaram que essa resistência parece ter uma base genética (MARTH, 1988).

De acordo com RYSER & MARTH (1991d) a incidência de listeriose humana é ainda desconhecida devido a três fatos: a) falta de dados dos casos mais prováveis em diversos países; b) inabilidade geral em detectar casos que não são severos e c) falta de uniformidade de registros da doença em diferentes países.

Dados fornecidos por SCHWARTZ et al. (1989) indicam que a *Listeria monocytogenes* é responsável por aproximadamente 1700 casos da doença, que ocorrem anualmente nos Estados Unidos.

A taxa de mortalidade nos casos diagnosticados como septicemia (uma das manifestações da listeriose) é de aproximadamente 30% para recém-nascidos, crianças e

pessoas com comprometimento imunológico enquanto, essa taxa chega a 70% quando a listeriose se manifesta através de meningites (LOVETT & TWEDT, 1988).

A listeriose humana é comumente caracterizada pela formação de granuloma e necroses onde o tamanho e número de lesões variam de pessoa para pessoa e estão relacionados com o número de microrganismos, idade e resistência do hospedeiro (MARTH, 1988). Durante a gravidez, a listeriose se manifesta por febre, dor de cabeça e urina descolorida, podendo algumas vezes, apresentar diarreia e ocasionalmente meningite. A listeriose na mulher grávida se desenvolve, na maioria das vezes, depois do quinto mês de gestação, levando a infecção ao feto. No entanto, infecções prévias podem ocorrer ocasionando dano ao embrião. Em recém-nascidos, normalmente ocorrem problemas respiratórios e cardíacos, convulsões, vômitos, granulomas e nódulos em diferentes órgãos. A meningite, meningoencefalite ou encefalite é uma das infecções mais sérias causadas pela listeriose, embora possa ocorrer em qualquer faixa etária. A doença normalmente afeta recém-nascidos e pessoas idosas, principalmente homens acima de 50 anos. Outra infecção também causada por esse microrganismo é a septicemia com faringites e mononucleoses, podendo ocorrer algumas vezes conjuntivite e em certos casos liderar a meningite, atingindo muito mais o adulto do que a criança. Alguns tipos de infecção podem resultar em artrites, osteomielite, abscessos espinhais e cerebrais e peritonites (MARTH, 1988 e RYSER & MARTH, 1991d).

Com respeito a carga infecciosa mínima, a literatura não apresenta nenhum dado para o estabelecimento de um padrão de qualidade microbiológica no controle da *Listeria monocytogenes*. De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, em animais de laboratório, 10^2 microrganismos por grama de alimento podem causar infecção visto que, em amostras analisadas, causadoras de um surto de listeriose humana, foram detectadas 10^2 - 10^5 unidades formadoras de colônias por grama de alimento (UFC/g) (DESTRO, 1990).

2.4. *Listeria monocytogenes* em animais

Apesar da ocorrência de *Listeria monocytogenes* em animais ser conhecida há anos, RALOVICH (apud RYSER & MARTH, 1991b) afirmou que o número de casos de listerioses em animais têm aumentado muito desde 1966 considerando que, foram registrados 2200 deles na Bulgária em 1976, 1000 na Alemanha Oriental em 1972 e 900 na Hungria em 1980.

A listeriose afeta diferentes tipos de animais como caprinos, ovinos, aves e outros. Os sintomas da doença são diversos, sendo a encefalite uma das manifestações mais comuns em ruminantes. Caprinos e ovinos normalmente morrem dentro de 2 a 3 dias depois do aparecimento dos sintomas enquanto, os bovinos sobrevivem pelo menos de 4 a 14 dias após o aparecimento dos mesmos. (RYSER & MARTH, 1991b; FENLON et al., 1999). Dentre os sintomas comumente observados em ruminantes encontram-se: distúrbios neurológicos, movimentos em círculos, paralisação de músculos da face e da garganta, estrabismos, conjuntivite, anorexia, temperatura elevada, excessiva salivação e septicemia (GRAY & KILLINGER, 1966).

Em aves, a septicemia é a manifestação da listeriose mais freqüentemente encontrada, podendo-se observar nefrites, peritonites, úlceras no íleo e ceco, necrose no oviduto, edema pulmonar, conjuntivite, lesões cardíacas. Os sintomas de falta de coordenação motora, tumores, paralisia são apresentados por aquelas que adquirem meningoencefalites (GRAY & KILLINGER, 1966; RYSER & MARTH, 1991b; GRAY, 1958).

Os peixes e outros frutos do mar também podem ser infectados por *Listeria monocytogenes* porém, muito pouco se sabe sobre a incidência desta bactéria nestes organismos (HARTMINK & GEORGSSON, 1991). De acordo com RYSER & MARTH

(1991b), o peixe apresenta intermitentes ataques de desatenção e agitação, cegueira aparente, falta de apetite, perda de sangue, lesões nas vísceras, etc.

Alguns animais, muitas vezes podem ser portadores assintomáticos de *Listeria monocytogenes* e com isso podem disseminar esta bactéria através de fezes e leite (GRAY & KILLINGER, 1966; RYSER & MARTH, 1991b; FENLON et al., 1996).

2.5. *Listeria monocytogenes* em alimentos

Em virtude dos inúmeros surtos ocorridos nos últimos anos, esse microrganismo tornou-se uma fonte de constante preocupação para as indústrias de alimentos (BRACKETT, 1988; MARTH, 1988). Segundo ROBERTS (1994), os alimentos são considerados a principal fonte de *Listeria monocytogenes* e, quando contaminados, podem causar infecção humana. Diferentes tipos de alimentos podem apresentar *Listeria monocytogenes*. No entanto, os produtos de laticínios e, mais recentemente, os derivados de carne são os mais envolvidos com casos de listeriose (FARBER et al., 1993).

2.5.1. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em laticínios.

Essa bactéria foi detectada por BECKERS et al. (1987) ao analisarem 69 amostras de queijo importado da França e 137 amostras de leite cru proveniente da Holanda. Dentre elas, a *Listeria monocytogenes* foi encontrada em sete amostras de queijos e em seis amostras de leite cru. Esse microrganismo também foi isolado de três outras amostras de queijo, após a utilização do processo de enriquecimento.

DOYLE & SCHOENI (1987) ao analisarem noventa amostras de queijo por três diferentes procedimentos (enriquecimento a frio, enriquecimento pelo método Food and

Drug Administration e enriquecimento de Doyle e Schoeni), conseguiram isolar *Listeria monocytogenes* de 46% das amostras estudadas.

FARBER et al. (1987) pesquisaram a incidência de *Listeria spp.* em 374 amostras de queijos macios e semi-duros provenientes de indústrias canadenses e das de outros países. A presença de *Listeria monocytogenes* foi constatada em 2 amostras de diferentes marcas originárias da França, sendo que em uma delas também foi verificada a presença de *Listeria innocua*.

Em estudo realizado por LOVETT et al. (1987), foram utilizadas 650 amostras de leite cru originárias de três regiões dos Estados Unidos da América (Califórnia, Massachusetts e três localidades ao redor de Cincinnati). A incidência de *Listeria monocytogenes* em leite não foi detectada em amostras oriundas do Estado da Califórnia, enquanto, aquelas provenientes das áreas próximas a Cincinnati e Massachusetts apresentaram porcentagens de contaminação de 3,7 e 7,0, respectivamente. No leite oriundo dessas regiões foi isolado também um total de 7,7% de *Listeria innocua*, 0,5% de *Listeria ivanovii*, 0,9% de *Listeria welshimeri* e 0,1% de *Listeria seeligeri*.

A presença de *Listeria monocytogenes* também foi investigada por COMI et al. (1987) em diferentes tipos de queijo provenientes da indústria e em um de origem artesanal, onde foi utilizado leite de cabra, perfazendo um total de 140 amostras analisadas. Como resultado, os autores constataram a presença desta bactéria apenas na amostra de origem artesanal.

Na Itália, CANTONI et al. (1988a) verificaram a presença de *Listeria monocytogenes* em 2,3% das 777 amostras de queijos analisadas. As maiores incidências foram constatadas em queijos dos tipos Italiano e Taleggio com 12,5% e 8,3%, respectivamente. Em análise semelhante, realizada com queijos importados, foi notado que 4,5% das 131 amostras

estavam contaminadas com o microrganismo procurado: queijos do tipo "Tilsit" (15,3%), "Cheddar" (16%) e "Eddam" (33%).

Em um outro trabalho, publicado por esses mesmos autores, foi utilizado um ensaio imunoenzimático para detectar a presença de *Listeria* em queijos, durante o período de um ano. Como resultado, os pesquisadores obtiveram amostras positivas para *Listeria monocytogenes* em 14 das 375 amostras de queijos Gorgonzola, 14 das 216 amostras de queijo Taleggio e 5 das 95 amostras de queijo italiano. Em outras 1150 amostras de outros tipos de queijo, os resultados foram negativos para essa mesma bactéria (CANTONI et al., 1988b).

PINI & GILBERT (1988), com o intuito de verificar a existência de *Listeria monocytogenes*, analisaram 222 amostras de queijos macios fabricados no Reino Unido e em outros países. Desses queijos, 16 foram produzidos com leite não pasteurizado, 41 com leite pasteurizado e 165 com leite cujo tratamento era desconhecido. Esse microrganismo foi detectado em 23 amostras (10%) sendo que a incidência em queijos originários da Itália, França, Cyprus e Reino Unido foi de 16%, 14% e 4%, respectivamente. *Listeria innocua* também foi isolada nos queijos em 9% das amostras estudadas.

Em estudo realizado por MASSA et al. (1990) foram analisadas 121 amostras de queijo, 20 amostras de manteiga e 40 amostras de leite cru, oriundos da Bologna (Itália). Dos produtos referidos, *Listeria monocytogenes* não foi detectada nas amostras de leite, nas de manteiga e nas dos queijos de curta maturação. No entanto, em queijos com o período de maturação mais prolongado, foi constatado a presença desse microrganismo na casca de duas amostras provenientes de pequenos produtores da região. Em duas das amostras de mussarela e em uma das de manteiga foi constatado a presença de *Listeria innocua*.

GENIGEORGIS et al. (1991), ao analisarem 100 amostras de queijos macios estilo hispânico comercializados ilegalmente no Estado da Califórnia, durante um período de seis meses, puderam verificar que 2 amostras foram positivas para *Listeria monocytogenes* e duas para *Listeria innocua*.

Na Noruega, RORVICK & YNDESTAD (1991) analisaram 460 amostras de diferentes produtos com o intuito de verificar a presença de *Listeria monocytogenes*. Dentre as amostras analisadas, 90 eram de queijos macios importados, onde os pesquisadores puderam verificar que 10 delas (11%) foram positivas para o microrganismo estudado. Como sete das amostras contaminadas foram adquiridas no mesmo lugar e todos os organismos pertenciam ao mesmo sorotipo, admitiu-se a hipótese de contaminação durante o manuseio dos queijos, no local de comercialização.

No período de novembro de 1988 a outubro de 1989, foram analisadas 4172 amostras de leite, queijo e outros produtos de laticínios produzidos na Inglaterra e País de Gales. Das amostras estudadas, 129 (3,1%) continham *Listeria monocytogenes*; a incidência desse microrganismo foi de 3,6% em leite não submetido a tratamento térmico, 1,1% em leite pasteurizado, 0,8% em leite de cabra, 1,8% em leite de ovelha, 8,2% em queijos maturados macios, 1,1% em queijos macios não maturados, 1,5% em queijos duros, 4,6% em queijos com leite de cabra, 0,7% em queijos com leite de ovelha, 4,2% em creme não tratado, 2,2% em iogurte e 2,0% em sorvete. Outras espécies de *Listeria* também foram encontradas em queijos macios maturados e em queijos fabricados com leite de vaca (GREENWOOD et al., 1991).

Na Irlanda, os pesquisadores HARVEY & GILMOUR (1992), verificaram a ocorrência de diferentes espécies de *Listeria* em 176 amostras de leite cru, 95 amostras de leite pasteurizado e 33 amostras de queijo macio, durante o período de um ano. Como resultado, foi encontrado que em leite cru a incidência de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Listeria seeligeri* foi de 15,3%, 10,2% e 2,8%, respectivamente. Por outro lado,

em amostras de leite pasteurizado foi observada a presença de *Listeria monocytogenes* em 1,05% das amostras enquanto, nas amostras de queijo macio, 3,03% foram positivas para *Listeria seeligeri*. Também na Irlanda, leites provenientes de 70 fazendas foram avaliados por REA et al. (1992) quanto a incidência de *Salmonella*, *Listeria* e *Escherichia coli*, durante um período de 13 meses. Destes leites, um total de 589 amostras foram analisadas, para verificar a presença de *Listeria spp.* Como resultado, essa bactéria foi isolada de 8,3% das amostras testadas sendo 4,9% positivas para *Listeria monocytogenes* e 3,4% para *Listeria innocua*.

Em Marrocos, EL MARRAKCHI et al. (1993) desenvolveram um estudo para verificar a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em 227 amostras de leite e derivados. A investigação revelou que a incidência dessa bactéria foi de 10% em leite cru, 18% em queijo tradicional e em leites fermentados como Raib e Lben, a ocorrência foi de 10% e 6%, respectivamente.

Queijos macios e semi-macios importados da Suíça foram analisados por LONCAREVIC et al. (1995) para verificar a presença ou não de *Listeria monocytogenes*. Esse patógeno foi detectado em 6% das 333 amostras estudadas. Os autores constataram que os queijos fabricados com leite cru apresentaram maior incidência de *Listeria monocytogenes* (42%) do que os queijos fabricados com leite termicamente tratado (2%). O número de *Listeria monocytogenes* detectado nos referidos queijos, variou entre $< 1 \times 10^2$ a 1×10^5 UFC/g. Sendo assim, os pesquisadores afirmaram que o uso do leite cru para fabricação dos queijos, representa um risco de saúde pública.

GAYA et al. (1998) realizaram um estudo para verificar a incidência de *Listeria monocytogenes* e outras espécies deste gênero em leite cru produzido na região central da Espanha. O leite coletado foi analisado duas vezes em cada estação, durante o período de um ano. Os dados revelaram que entre 774 amostras de leite, *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* foram detectadas em 3,62 e 2,71% das amostras analisadas,

respectivamente. Como através do plaqueamento direto em ágar Oxford (OXA) não foi possível isolar esse microrganismo, os pesquisadores assumiram que os leites possivelmente continham concentrações inferiores a 10 UFC/ml.

URARTE e colaboradores (1999) ao estudarem a qualidade de queijos frescos, comercializados na comunidade autonoma do país Basco, constataram que dentre 98 amostras coletadas de diferentes marcas, 50% continham Enterobacteriaceae, 5% *Bacillus cereus* ($>10^4$ UFC/g), 12% *E. coli*, 2% *Staphylococcus aureus* ($>10^4$ UFC/g) e 1% *Listeria monocytogenes*. Os resultados observados durante a fabricação dos queijos indicam que os padrões de higiene não foram seguidos, resultando em contaminação de origem fecal.

No Egito, EL-PRINCE (1999) ao analisar 200 amostras de leite cru, queijo Domiati e 50 amostras de manteiga e de iogurte, obtidas em diversos pontos de comercialização e fazendas na cidade de Assiut, verificou que *Listeria monocytogenes* estava presente em 2% das amostras de leite cru como, também, em 2% das amostras de queijos. *Listeria innocua* foi isolada em 2% das amostras de leite e 4% das amostras de manteiga.

No Brasil, DESTRO et al. (1991) analisaram 20 amostras de leite cru, pasteurizado e queijo Minas frescal provenientes da região de Campinas (S.P.), no período de janeiro de 1989 a maio do mesmo ano. Nas amostras de leite cru e pasteurizado estudadas, não foi detectada a presença de *Listeria monocytogenes*. No entanto, em duas amostras de leite cru foi verificada a presença de *Listeria innocua*. Em queijos Minas frescal, encontrou-se 10% de *Listeria monocytogenes*, 30% de *Listeria innocua*, 5% de *Listeria seeligeri* e *Listeria welshimeri*. Ao concluir o trabalho, os autores afirmaram que a contaminação do queijo Minas frescal poderia ser resultado de problemas no manuseio, durante e depois do processamento do queijo ou limpeza imprópria na indústria.

Amostras de leite cru e de leite pasteurizado ambos dos tipos B e C, provenientes de uma usina de beneficiamento da cidade de São Paulo (S.P.), foram utilizadas para

averiguação da incidência de *Listeria spp.* De cada produto, foram analisadas 110 amostras. Do leite cru tipo C foram isolados 12,7% de *Listeria monocytogenes*, 13,6% de *Listeria innocua* e 1,8% de *Listeria welshimeri*. Do leite cru tipo B as porcentagens detectadas de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Listeria grayi* foram de 6,4%, 5,4% e 0,9%, respectivamente. Com respeito ao leite pasteurizado tipo B, foi encontrado que 1,8% das amostras eram positivas para *Listeria innocua* enquanto as amostras de leite pasteurizado tipo C apresentaram resultados negativos para *Listeria spp.* (MOURA,1992).

CASSAROTTI (1993) adquiriu, de vários pontos de venda da cidade de Piracicaba (S.P.), amostras de leite cru, leite pasteurizado tipo C e de queijo Minas frescal, com a finalidade de verificar a presença de *Listeria monocytogenes* nos referidos alimentos. Um total de 20 amostras de cada produto foi investigado e, segundo o autor, não foi detectada a presença desse microrganismo ou outra espécie desse mesmo gênero.

Cento e três amostras de vários tipos de queijos, produzidos na cidade do Rio de Janeiro, foram analisadas para verificar a incidência de *Listeria monocytogenes* e outras espécies de *Listeria*. Entre as amostras analisadas, 11 (10,68%) continham *Listeria monocytogenes*, 13 (12,62%) *Listeria innocua*, 6 (5,83%) *Listeria grayi* e 1 (0,97%) *Listeria welshimeri*. Nos queijos Minas frescal, fabricados artesanalmente, foi encontrado um alto nível contaminação; sendo que, das 17 amostras analisadas, 7 (41,17%) continham *Listeria monocytogenes*. Em queijos fabricados industrialmente como Ricota e Minas frescal, 3,03% das amostras estavam contaminadas com esse patógeno. Nos queijos maturados como o Gorgonzola, Brie e Roquefort, *Listeria monocytogenes* foi encontrada em 5,67% das amostras. De acordo com os pesquisadores, dois fatores podem ter contribuído para essa contaminação. Primeiro, a bactéria láctica utilizada no processamento não inibiu completamente *Listeria monocytogenes* e segundo, um rápido aumento do pH durante a maturação dos queijos permitiu o crescimento desse microrganismo (SILVA et al., 1998).

Na cidade de Goiânia 100 amostras de leite foram analisadas, com o intuito de verificar a presença de *Listeria* spp. Das amostras analisadas, 50 eram de leite cru e as outras 50 de leite pasteurizado. *Listeria* foi isolada de 8% das amostras de leite cru, mas não foi encontrada em amostras de leite pasteurizado (OLIVEIRA et al., 1998).

É interessante notar que em todas essas pesquisas relatadas sobre o assunto, não foram estudadas medidas de controle para a produção do leite e/ou queijos livres de *Listeria* spp.

2.6. Fatores que afetam a termorresistência, sobrevivência e multiplicação de *Listeria monocytogenes* em alimentos.

A resistência térmica da *Listeria monocytogenes* tem sido um tema muito discutido entre diversos pesquisadores. Alguns trabalhos como os de DOYLE et al. (1985), RYSER et al. (1985), FERNANDEZ GARAYZABAL et al. (1986) e DOYLE et al. (1987) defendem a idéia que a *Listeria monocytogenes* é resistente a pasteurização (71,7°C/15s) enquanto, outras publicações de BRADSHAW et al. (1985), BUNNING et al. (1986), BRADSHAW et al. (1987), BECKERS et al. (1987), CANILLAC & MOUREY (1993) e MENENDEZ et al. (1997) afirmam que esse tratamento térmico é efetivo contra essa bactéria. CASADEI et al. (1998) em seu estudo sobre a resistência térmica de *Listeria monocytogenes* em produtos de laticínios, afirmaram que o processo eficiente para eliminar esse patógeno foi 72,7°C/15 segundos. De acordo com CARMINATI (1992), a discordância de resultados obtidos na pesquisa, pode estar embasada em diferentes propostas metodológicas, emprego de substrato, instrumentos, inóculo e meios de cultura diferentes.

Simulações realizadas com um modelo matemático e com ajuda de um "software" de análise de risco (@RISKTM), utilizando dados experimentais de inativação térmica de *Listeria monocytogenes*, confirmaram que a pasteurização a 72°C/15 segundos (condições

da Federação Internacional de Laticínios-IDF) pode assegurar, pelo menos, 11 reduções logarítmicas de *Listeria monocytogenes* (PIYASENA et al., 1998).

Estudos realizados por BRADSHAW et al. (1985) tiveram como objetivo verificar a resistência térmica da *Listeria monocytogenes* linhagem Scott A, em leite integral estéril, onde foi utilizada uma suspensão bacteriana de 10^5 células/ml e sete temperaturas diferentes (52,2; 57,8; 63,3; 66,1; 68,9; 71,7 e 74,4°C), empregando trocadores de calor. Como resultado, os pesquisadores obtiveram um valor $D_{71,7^\circ\text{C}}$ igual 0,9 segundos, concluindo que a *Listeria monocytogenes* não poderia sobreviver ao processo da pasteurização. Dois anos mais tarde, os autores acima citados realizaram um estudo com alguns produtos de laticínios, tendo como no trabalho anterior, o mesmo objetivo e utilizando a mesma concentração de microrganismos. Dessas análises foi observado que o valor $D_{71,7^\circ\text{C}}$ em leite desnatado e leite integral variou de 1,7 a 2,7 segundos. Dessa forma, os autores puderam reafirmar a efetividade do processo de pasteurização (BRADSHAW et al., 1987)

BECKERS et al. (1987) utilizaram diferentes linhagens de *Listeria monocytogenes*, isoladas de 3 tipos de queijos e uma linhagem estoque, para dois diferentes testes de resistência térmica. Em um deles, tubos abertos contendo os microrganismos dissolvidos em caldo triptose, foram submetidos a diversas temperaturas de pasteurização (60, 65, 70, 75 e 80°C) em banho-maria em tempos diferentes de exposição ao calor. No outro experimento, o estudo da termoresistência foi realizado utilizando-se bolsas plásticas contendo 1 ml de cultura de bactéria aquecidas, também em banho-maria, à temperaturas de 64, 67 e 70°C. Como conclusão, os pesquisadores afirmaram que os testes onde se utilizam tubos abertos fornecem resultados dúbios e que a *Listeria monocytogenes* não sobrevive quando o tratamento térmico aplicado for de 72°C e 74°C por 14 e 10 segundos respectivamente.

Para comprovar se os tubos abertos apresentavam problemas, no que diz respeito a pasteurização, DONNELLY et al. (1987) realizaram um experimento, com 3 linhagens de

Listeria monocytogenes em tubos selados e em tubos de ensaio abertos. Foi observado, que quando se utilizou tubos selados, uma rápida inativação térmica ocorreu nas linhagens empregadas, obtendo um valor $D_{62^{\circ}\text{C}}$ de 0,1 a 0,4 minutos. Em tubos de ensaio abertos, a resposta obtida foi muito distinta da anterior ou seja, não foi possível completa inativação a 62°C durante um período de 30 minutos. Desse modo, estes pesquisadores confirmaram o que foi descrito por BECKER et al. (1987), ao afirmarem que o procedimento no qual se utilizam tubos abertos, para testar resistência térmica, não apresenta resultados corretos. Para explicar este fato, os autores sugeriram duas hipóteses. A primeira delas, afirma que as células, durante o processo de aquecimento, podem ser arrastadas pelo condensado e atiradas até a tampa do tubo. A segunda, sugere que durante a inoculação, os microrganismos podem cobrir parte da parede dos tubos. Desse modo, em ambos os casos, a população de bactérias não estaria exposta à temperatura de inativação, como aquelas que se encontram abaixo do nível no banho de aquecimento.

BRADSHAW et al. (1991) ao estudarem a resistência térmica de *Listeria spp.* em leite cru e estéril utilizaram tubos selados, contendo 10^5 células/ml, imersos em banho-maria com diferentes temperaturas. Os valores D apresentados em leite cru para *Listeria monocytogenes* BS-9, Scott A e SE-31 a $71,7^{\circ}\text{C}$ foram de 2,2; 2,0 e 1,5, segundos respectivamente. Em leite estéril, para a linhagem SE-31, o valor D obtido a $71,7^{\circ}\text{C}$ foi de 4,4 segundos. Como conclusão, os autores consideraram que a presença desta bactéria após a pasteurização significa deficiência do processo ou, ainda, uma contaminação após o processamento térmico.

FARBER et al. (1988) avaliaram a resistência térmica da *Listeria monocytogenes* tanto em leite cru, inoculado com diferentes linhagens desta bactéria, como também em leite naturalmente contaminado ou seja, obtido de vacas doentes. O microrganismo estudado foi incapaz de sobreviver nos leites utilizados, quando a temperatura empregada foi maior do que $67,5^{\circ}\text{C}$ com um tempo mínimo de 16,2 segundos. Com estes dados, os pesquisadores admitiram que possa ocorrer a presença de *Listeria*, como sobrevivente ao processo, onde

se aplicam tempos curtos de pasteurização a temperaturas de 60 a 67,5°C fato este, preocupante no que diz respeito aos queijos processados com leite aquecido ou ainda com leite cru.

No intuito de verificar a influência da composição química de produtos de laticínios sobre a resistência térmica de duas linhagens de *Listeria monocytogenes* (1151 e Scott A), CASADEI et al. (1998) utilizaram tubos capilares selados, que foram submetidas às temperaturas de 52, 56, 60, 64, e 68°C em determinados intervalos. Os resultados mostraram que a resistência térmica de ambas as linhagens foi maior nos produtos de laticínios do que em caldo de soja tripticase (TSB), quando submetidos às mesmas temperaturas. Foi constatado também, maiores diferenças nos valores de D obtidos à baixas temperaturas (52 e 56°C). Para ambas as linhagens, o efeito da temperatura foi altamente significativo ($P < 0,001$). Em um segundo experimento, *Listeria monocytogenes* Scott A foi primeiramente cultivada nos derivados de laticínios até a fase estacionária, para depois ser submetida ao tratamento térmico à 60°C. O resultado desse experimento revelou que ocorreu um aumento da resistência térmica desse patógeno. Ao concluir o trabalho, os autores enfatizaram que é fundamental considerar as condições de crescimento da *Listeria monocytogenes* antes do tratamento térmico.

Segundo DOYLE et al. (1987), a resistência térmica da *Listeria monocytogenes* durante o processo de pasteurização, pode estar ligada ao fato desse microrganismo, muitas vezes se encontrar localizado intracelularmente nos leucócitos. Alguns trabalhos ainda mencionaram, que quando o número desses microrganismos for elevado ($\geq 10^6$ microrganismos/ml), eles podem sobreviver a pasteurização comercial dentro dos leucócitos ou até mesmo em suspensão (BUNNING et al., 1988 e SUÀREZ-FERNANDES et al., 1989).

BUNNING et al. (1986) estudaram a resistência térmica da *Listeria monocytogenes* utilizaram bactérias, localizadas no interior de fagócitos de camundongos, suspensas em leite

cru, em concentrações aproximadas de 10^5 microrganismos /ml. O valor $D_{71,7^\circ\text{C}}$ de 1,9s foi obtido para as células fagocitadas e, para células em suspensão o $D_{71,7^\circ\text{C}}$ foi de 1,6 segundos. Diante dos resultados obtidos, os pesquisadores concluíram que a posição intracelular da *Listeria monocytogenes* não protege este microrganismo da inativação térmica. Posteriormente, em outro trabalho, BUNNING et al. (1988) estudaram a cinética de inativação térmica de células de *Listeria monocytogenes* localizadas em fagócitos de bovinos e também em suspensão no leite. Para tanto, fizeram uso de tubos selados imersos em banho-maria e trocador de calor, cuja faixa de temperatura aplicada variou entre 57,8 e 74,4°C. Em ambos os casos, a contagem inicial de bactérias foi de 10^6 células/ml. Os dados obtidos mostraram que a posição intracelular dos microrganismos não os protegeram do processo de pasteurização, confirmando, deste modo, o que foi descrito por BUNNING et al. (1986). No entanto, KNABEL et al. (1990) discordaram desta afirmação, citando que esses pesquisadores não conseguiram recuperar as células de *Listeria monocytogenes*, pois não utilizaram técnicas estritamente anaeróbias.

Uma outra explicação para a resistência térmica de *Listeria monocytogenes*, é que essas bactérias podem adquirir termorresistência, quando previamente tratadas com aquecimento brando (BRADSHAW et al., 1987). Idéia esta que foi posteriormente confirmada no trabalho descrito por FEDIO & JACKSON (1989) quando, os mesmos, com o objetivo de determinar a possibilidade de aumento da resistência térmica da *Listeria monocytogenes*, submeteram a cultura microbiana a um pré-aquecimento à 48°C por uma hora em caldo de soja tripticase suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE) e em leite processado por altas temperaturas (UHT). A seguir, para o estudo da morte térmica, essas bactérias foram aquecidas a uma temperatura de 60°C e subsequentemente monitoradas em diversos tempos, através do plaqueamento da suspensão aquecida sobre ágar de soja tripticase suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) e ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM) que foram incubadas a 37°C por 48 horas.

O aumento da termorresistência adquirida pelas linhagens de *Listeria monocytogenes*, quando esse microrganismo foi previamente submetido a um choque térmico (antes do aquecimento), também foi descrito por KNABEL et al. (1990), LINTON et al. (1990), FARBER et al. (1990), QUINTAVALLA et al. (1991), LINTON et al. (1992), JORGENSEN et al. (1996), PAGÁN et al. (1997) e ROWAN & ANDERSON (1998). O aumento de resistência térmica, induzido pela exposição à temperaturas, acima da temperatura ótima de crescimento do microrganismo, resulta em uma resposta fisiológica, ou seja, ocorre a síntese de proteínas especiais denominadas de proteínas do choque térmico (PCT). De acordo com SOKOLOVEVIC & GOEBEL (1989) e JORGEWSEN et al. (1996) apud PAGÁN et al. (1997) a *Listeria monocytogenes* pode produzir 12 a 14 tipos diferentes de proteínas do choque térmico. Tendo como base este fato, esses últimos pesquisadores concluíram que a diferença na termotolerância poderia ser devida à síntese de diferentes quantidades ou de diferentes proteínas do choque térmico a diferentes temperaturas. No entanto, é importante ressaltar que, apesar das proteínas do choque térmico sabidamente exercerem um papel de proteção para esse microrganismo, o seu mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido.

O aumento da resistência térmica adquirida pelas células de *Listeria monocytogenes* Scott A, também foi estudado por LINTON et al. (1990). Estes pesquisadores utilizaram um banho-maria, pré-aquecido com circulação de água, para produzir o choque térmico. As temperaturas utilizadas nesse experimento foram 40, 44 e 48° C, empregando-se diferentes tempos (3, 10 e 20 minutos) para cada uma delas. Observações posteriores indicaram que a resistência térmica da *Listeria monocytogenes* aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) com a elevação da temperatura e do tempo. No plaqueamento em meio não seletivo, a resistência maior desta bactéria foi encontrada para as células aquecidas à 48°C por 20 minutos, diferindo significativamente ($p \leq 0,05$) dos valores encontrados para o meio seletivo. No entanto, não ocorreu diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tempos 10 e 20 minutos à temperatura de 48°C, em ambos os meios estudados.

Com o objetivo de verificar a termotolerância máxima de *Listeria monocytogenes* crescida a 37° C e 4° C, PAGÁN et al. (1997) fizeram um estudo para determinar uma ótima combinação entre tempo e temperatura de choque térmico. Os pesquisadores afirmaram que a máxima termotolerância induzida às células de *Listeria monocytogenes*, pelo choque térmico, foi grandemente dependente da temperatura e da duração do tratamento aplicado. De acordo com esses pesquisadores, células de *Listeria monocytogenes* crescidas a 4° C, depois de receberem o choque térmico, tiveram um aumento máximo de sete vezes em sua termotolerância enquanto que, as células crescidas a 37° C, depois de receberem o mesmo tratamento, aumentaram sua resistência térmica apenas 4 vezes.

O efeito da temperatura de crescimento na termotolerância de dois tipos morfológicos de células de *Listeria monocytogenes* foi estudado por ROWAN & ANDERSON (1998) em leite integral. As linhagens de *Listeria monocytogenes* (10^3 células/ml) depois de cultivadas a 37 e 42,8°C por 24 horas em leite integral, foram inoculadas em tubos com rosca, contendo de $1,5 \times 10^8$ a $3,0 \times 10^8$ células/ml. Os tubos foram então aquecidos a 56°C/2 horas, 60°C/1hora e 63°C/30 minutos e o máximo de sobreviventes foi determinado através do plaqueamento em ágar de soja tripticase suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) e em ágar seletivo para *Listeria*. Os dados obtidos mostraram que apesar da temperatura de aquecimento ter tido um efeito maior na termotolerância isto é, a temperaturas mais altas ocorreu grande redução do número de células, os valores D e a média de recuperação foram maiores a todas as temperaturas de aquecimento testadas, quando as células tiveram seu crescimento a 42,8°C, resultando um aumento na termotolerância de 2,5 - 3,0 vezes, quando comparado com as que cresceram a 37°C.

A destruição térmica da *Listeria monocytogenes* em leite desnatado, na presença da bacteriocina nisina, foi descrito por MAISNIER-PATIN et al. (1995). No desenvolvimento desse experimento, os pesquisadores fizeram uso de tubos capilares, contendo 2×10^6 UFC/ml de microrganismos dissolvidos em leite, onde, após o selamento das extremidades dos mesmos e descontaminação da parte externa com solução de hipoclorito, os tubos foram

estocados em uma mistura água-gelo até sua utilização. Em uma etapa posterior, esses capilares foram deixados a temperatura ambiente por 5-6 minutos e, a seguir, imersos em banho de água a 54, 56, 58, 60, 62 ou 65°C. Decorrido o tempo previamente estabelecido, os tubos foram removidos e rapidamente resfriados. Para enumeração dos microrganismos, o conteúdo de 100µl, oriundos dos capilares processados, foram distribuídos (através de técnica de superfície) em placas de ágar de soja tripticase suplementado com 0,6% p/v de extrato de levedura, seguidas de incubação por um período de 5 dias a 30°C, sob condições aeróbias. Nas temperaturas acima descritas, a adição de 25 UI ou 50 UI de nisina/ml de leite, resultou na diminuição do tempo de aquecimento necessário, para alcançar 3 reduções decimais no número de *Listeria monocytogenes* presente. Foi constatado também, que a redução mais acentuada no tempo, ocorreu quando foram utilizadas concentrações de 50 UI de nisina.

Mais recentemente, KNIGHT et al. (1999) realizaram um estudo para verificar a resistência de *Listeria monocytogenes* Scott A em ovo integral líquido. Nos experimentos realizados em ampolas de vidro, foi utilizada nisina (10mg/ml) e NaCl (10%). Depois do tratamento térmico, as amostras foram plaqueadas em ágar não seletivo e, em determinados intervalos, o valor D foi determinado. Como resultado, foi constatada a redução de 4 ciclos logarítmicos no número de células viáveis na primeira hora de experimento, quando a nisina foi adicionada ao ovo integral líquido sem sal. A adição de nisina diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) o valor D à baixas temperaturas ($< 58^\circ\text{C}$), em ovo integral líquido, na presença ou ausência de sal. No entanto, esta bacteriocina pouco afetou o valor D, quando se usou pasteurização. Quando a nisina foi adicionada 2 horas antes do tratamento térmico, o valor D diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$)

2.6.1. Outros fatores extrínsecos que afetam o crescimento de *Listeria monocytogenes*

Existem diversos fatores que interferem no crescimento e multiplicação da *Listeria monocytogenes* em alimentos. A natureza do alimento, pH, a_w , temperatura, cloreto de sódio, nitrito de sódio e conservadores, destacam-se entre os mais importantes. Entretanto, deve-se destacar que esses fatores, normalmente não atuam isoladamente, ou seja, apresentam efeitos de interações no desenvolvimento do microrganismo.

GEORGE et al. (1988) com o intuito de estudar o efeito do pH e da temperatura sobre o crescimento inicial de 16 linhagens de *Listeria monocytogenes* cultivadas em meio nutriente observaram que houve variação dos valores de pH em função da temperatura utilizada. Deste modo, para ocorrer o crescimento os valores de pH mínimos utilizados foram 4,39 para temperaturas de 20 e 30°C; 4,62 para 7 e 10°C e 5,23 para 4°C.

GEORGE & LEVETT (1990) estudaram o efeito do pH e da temperatura sobre o crescimento de *Listeria monocytogenes* em salada contendo repolho, cenoura, cebola e maionese. Neste experimento, as saladas tiveram seus pH ajustados para 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 sendo logo após, inoculadas com 10^6 UFC/ml e submetidas à temperaturas de 4, 15 e 25°C. Os resultados mostraram que a bactéria foi incapaz de crescer em saladas, com pH original 3,9 e em pH 4,0, nas três temperaturas estudadas. O pH ajustado a 5,0 também mostrou-se inibitório nas temperaturas estudadas. Já em pH 6,0, apesar de ter ocorrido um declínio no número de células viáveis nas temperaturas de 4 e 15°C, à 25°C foi constatado um aumento ($> 10^9$ UFC/g) no número de microrganismos, que permaneceu elevado depois da incubação por 25 dias. Em pH 7,0, o crescimento desta bactéria embora tenha sido rápido nas três temperaturas estudadas, apresentou um declínio depois do décimo dia, o qual foi explicado pela produção de ácidos pelos microrganismos, como resultado da fermentação.

Para a obtenção de mais informações a respeito da sobrevivência da *Listeria monocytogenes* em meios de caldo com baixos valores de pH, PARISH & HIGGINS (1989)

cultivaram quatro linhagens deste microrganismo, em caldo de soja tripticase suplementado com 0,6% de extrato de levedura. Os meios utilizados tiveram pH variando de 0,5, na faixa de 3,5 a 7,0. Os resultados observados mostraram que o crescimento para todas as linhagens desta bactéria ocorreu em valores de pH 4,5 ou superiores, durante a incubação a 30°C por 96 horas, sendo que o crescimento não ocorreu a pH 4,0 ou inferior. Neste mesmo trabalho, os pesquisadores utilizaram como meio de cultura soro de laranja estéril distribuído em tubos de ensaio, com ajuste de pH entre 3,6 a 5,0, mantendo-se intervalos de aumento de 0,2 unidades. Após a adição do inóculo, os tubos foram submetidos à temperaturas de 4 e 30°C. A incubação a 4°C revelou que as células viáveis foram recuperadas em concentrações de 10² UFC/ml, depois de 90 dias de cultivo a pH 4,8 e 5,0, enquanto outros cultivos nesta mesma temperatura apresentaram menos de 25 UFC/ml a pH 3,6; 4,0 e 4,6, após 25, 43 e 81 dias, respectivamente. Quando a temperatura utilizada foi 30°C, foi constatado que as células não eram viáveis a pH 3,6; 3,8 e 4,0, depois de 5 dias de cultivo e, em pH 4,2 e 4,4, depois de 8 dias. Foi observado, também, que em pH 4,6, 25 UFC/ml eram viáveis em 8 dias de experimento. Finalizando o trabalho, os autores concluíram que a *Listeria monocytogenes* é capaz de crescer em valores de pH inferiores a 5,0 e que esse microrganismo resiste mais à temperatura de refrigeração do que a 30°C.

COLE et al. (1990), ao estudarem o efeito do pH, concentração de sal e da temperatura sobre a sobrevivência e crescimento de *Listeria monocytogenes* em meio de cultura, verificaram que em baixos valores de pH e altas concentrações de sais a sobrevivência desta bactéria, encontrou-se altamente relacionada a temperatura aplicada. Os valores mínimos de pH que permitiram a sobrevivência deste microrganismo após 4 semanas, utilizando um inóculo de 10⁴ células, foram de 4,66 à 30°C; 4,36 à 10°C e 4,19 à 5°C tendo como concentrações máximas de NaCl 4, 10 e 18%, respectivamente. No que diz respeito ao crescimento, os menores valores de pH que permitiram um aumento do número de células durante 60 dias foram : 4,66 à 30°C; 4,83 à 10°C e 7,0 à 5°C.

BAILEY et al. (1990), estudaram a eficácia de meio de enriquecimento (LEB), ajustado a diversos valores de pH, para recuperação de *Listeria monocytogenes* Scott A não injuriada e injuriada pelo calor. Nenhuma célula desse microrganismo foi obtida quando o pH do LEB foi menor que 5,2. Quando o número de células não injuriadas e injuriadas foi menor que 4 e entre 200-1100, respectivamente, não foi possível a recuperação dessa bactéria, a pH inferior a 5,5.

Para comprovar os efeitos do cloreto de sódio, pH e temperatura, no crescimento da *Listeria monocytogenes*, Mc CLURE et al. (1989) utilizaram placas gradientes e meio líquido. Dessa forma, foi possível observar que o padrão de crescimento desta bactéria foi similar nas quatro temperaturas estudadas (20°C, 25°C, 30°C e 35°C) após 24 horas de cultivo em placas gradientes. Quando a temperatura utilizada foi 20°C, uma concentração de 8,8% de NaCl foi necessária para limitar o crescimento entre pH 6,6 e 7,6, não ocorrendo crescimento em valores de pH inferiores a 4,95 nas concentrações estudadas do sal. A 25°C, a faixa de crescimento foi ampliada até a concentração de 9,9% de NaCl em uma faixa de pH de 6,6 e 7,9. Na faixa de 30 a 35°C, ocorreu um aumento da tolerância ao sal (> 9,9%) em pH neutro e, a área de crescimento estendeu-se até pH igual a 4,6. Quanto ao experimento em microplacas, durante um período de 24 horas a 25°C, o crescimento foi observado a pH 4,5, quando baixas concentrações de NaCl foram utilizadas e, a pH mais elevado quando concentrações de até 10% estavam presentes no meio.

Em 1991, Mc.CLURE et al. realizaram um experimento em meio de cultura (caldo de soja e triptona) com o intuito de estudar o efeito da combinação da temperatura de incubação, pH, cloreto de sódio e nitrito de sódio no crescimento da *Listeria monocytogenes*. Neste trabalho, foi utilizado inóculo de 4×10^3 UFC/ml e concentrações de 0,5 a 8,0% p/v de NaCl e zero a 400 µg/ml de NaNO_2 . Os valores de pH, também foram acertados para as diferentes concentrações, permanecendo numa faixa que variou de 4,6 a 7,4. Para isso, foi utilizado um sistema automático turbidimétrico com placas, sendo as mesmas incubadas a temperaturas que variaram de 5 a 30°C, por um período de 21 dias. Foi

verificado que o crescimento da *Listeria monocytogenes* em baixos níveis de pH foi fortemente influenciado pela temperatura de incubação e pela concentração de NaNO₂. Dessa forma, quando a temperatura de 20°C e concentrações de 50 µl/ml de NaNO₂ foram empregadas, nenhum crescimento foi notado a valores de pH 5,3 ou inferiores, para quase todas as concentrações de NaCl.

Os efeitos de interações de diferentes concentrações de NaCl (0,5%; 2,5%; 5,0%; 7,5% e 10%), pH (4,2; 5,0; 6,6; 8,0 e 9,6) e temperaturas (4°C, 10°C, 22°C, 37°C e 43°C) sobre a cinética de reparo de *Listeria monocytogenes* ATCC 51414, em caldo para reparo de *Listeria* (LRB), foram determinados por CHAWLA et al. (1996). As células de *Listeria monocytogenes* depois de serem submetidas ao tratamento térmico de 56°C por 20 minutos, foram centrifugadas sob refrigeração (16270 x g por 10 minutos). O precipitado obtido foi ressuspensão em LRB, previamente ajustado com diferentes concentrações de sal e pH. Após diluições seriadas, o plaqueamento foi realizado em meio não seletivo em ágar triptose fosfato (TPA) e em meio seletivo TPA com 4g de NaCl por litro (TPAN). O caldo LRB foi incubado a diferentes temperaturas, por um período de 21 dias. Durante esse tempo, amostras foram retiradas em determinados intervalos, diluídas e semeadas nos dois meios de cultura acima citados. Análise de variância (ANOVA) revelou que tanto a temperatura como a concentração de sal tiveram efeitos significantes ($p < 0,001$) no tempo de reparo. Nas células de *Listeria monocytogenes* injuriadas não ocorreu reparo a 4 e 10°C em pH 4,2, para todas as concentrações de sal testadas. Também nessas temperaturas, não ocorreu nenhum reparo quando a concentração de sal foi maior ou igual a 2,5 e maior ou igual a 5% respectivamente em qualquer pH utilizado, durante os 21 dias de vida de prateleira. No entanto, quando a temperatura utilizada foi 37°C com pH 5,0 o reparo das células injuriadas foi mais rápido do que em outras temperaturas, em todas as concentrações de sal testadas. Ótimas condições para o reparo de células de *Listeria monocytogenes* foram a 37°C e 0,5% de NaCl em pH 8,0 com tempo de reparo de 5,5 horas. Os pesquisadores concluíram que a temperatura mínima necessária para o reparo das células injuriadas aumenta com o aumento da concentração de sal.

A influência do pH, do sal, e da temperatura sobre *Listeria monocytogenes* também foi estudado por MARTINIS et al. (1997). Neste experimento, foram utilizadas placas de Petri, contendo caldo de soja tripticase com 1,5% de Bacto ágar , suplementado com 0,5% de glucose. Para cada ensaio, o meio de cultura teve o seu pH corrigido com HCl 2N até valores finais de 5,5 , 6,0 e 6,5 e acréscimo da concentração de 100 UI/ml de Nisaplin (Applin Barret). Aliquotas de 50 µl de cultura contendo 10⁹ UFC/ml de *Listeria monocytogenes* Scott A foram plaqueadas com ajuda do "Spiral Plater" e incubadas a 10, 20 e 30°C. Os resultados mostraram que as concentrações de NaCl e o pH tiveram pouco efeito sobre o crescimento e formação de colônias desse microrganismo, quando as temperaturas empregadas foram 20 e 30°C. Sob estas condições, somente 1 em 10⁵ células foram obtidas. A 10°C, as células resistentes à nisina foram influenciadas tanto pela concentração de NaCl, como também pelo pH, ocorrendo uma diminuição na formação de colônias quando os mesmos foram reduzidos. Nessa temperatura, não houve crescimento de *Listeria monocytogenes* quando foram empregados 0,5% de NaCl e pH 5,5. Esses pesquisadores afirmaram que concentrações de 2,0 a 3,5% de NaCl parecem desempenhar um papel protetor, permitindo que as colônias resistentes à nisina se formem a 10° C.

HUDSON (1992) realizou um estudo para verificar a eficácia de altas concentrações de cloreto de sódio na destruição da *Listeria monocytogenes* em meio infusão cérebro coração (BHI). Para isto, foram empregadas quantidades de 6, 16 e 26% p/v de NaCl e temperaturas de 10°C e de 0 a 4°C para a incubação por um curto período de 6 horas enquanto que para longos períodos, ou seja, 33 dias além das temperaturas já citadas utilizou-se também -18°C. Os resultados mostraram que a incubação por 6 horas, nas diversas concentrações de sais testados, não foi efetiva na redução do número de microrganismos à baixas temperaturas. Quando a incubação foi realizada em tempos prolongados, foi observado que a concentrações de 6% ocorreu crescimento da bactéria estudada à 10°C e à temperatura de sub refrigeração, enquanto que, a -18°C não houve mudanças no número de células. Com 16%, nenhuma mudança significativa no número de

microrganismos foi detectada. No entanto, quando foi utilizado 26% de NaCl, apesar de não ter sido notada variação no número de células a -18°C, ocorreu um declínio nas outras duas temperaturas testadas.

O meio de infusão cérebro coração (BHI) também foi utilizado por MILLER (1992) para verificar o efeito do cloreto de sódio e outros solutos em relação a atividade de água no crescimento e sobrevivência da *Listeria monocytogenes* Scott A. Este meio, contendo 0,5% de NaCl, foi ajustado com NaCl, glicerol ou propileno glicol para níveis de atividade de água que variaram de 0,99 a 0,80. Nos meios onde foi utilizado NaCl, esta bactéria sobreviveu nas diferentes atividades de água dentro de uma faixa de 200 a 700 horas, à temperatura de 28°C. Os níveis mínimos de atividade de água para o crescimento deste microrganismo foram de 0,90 para glicerol, 0,92 para NaCl e 0,97 para propileno glicol.

Com o objetivo de conhecer os mínimos valores de atividade de água, requeridos para o crescimento da *Listeria monocytogenes*, TAPIA de DAZA et al. (1991) também desenvolveram um trabalho utilizando inóculos de 10^2 e 10^4 UFC/ml de duas linhagens desse microrganismo (Scott A e Brie 1). Para isso, foram empregados o meio de caldo de soja tripticase (TSB) e quantidades de NaCl, glicerol e sacarose, para a obtenção de diferentes atividades de água. Após a incubação em duas diferentes temperaturas foi observado que, a 4°C, ambas as linhagens foram mais sensíveis aos solutos utilizados do que as cultivadas a 30°C. A menor atividade de água, encontrada para o crescimento da bactéria acima mencionada foi 0,90, tanto para a linhagem Scott A como para a Brie 1, quando mantidas a 30°C em meio contendo glicerol. Para os meios suplementados com NaCl e sacarose foi encontrado o valor de 0,92 para a Scott A, sendo que para Brie 1 os resultados obtidos foram 0,92 e 0,96, respectivamente.

Os efeitos combinados de atividade de água e temperatura no crescimento de linhagens de *Listeria monocytogenes* também foram estudados por FARBER et al. (1992). Neste ensaio, o meio Infusão Cérebro Coração foi utilizado e ajustado a diferentes valores

de atividade de água (0,86 a 0,99) através do emprego de 3 diferentes umectantes (NaCl, glicerol e sacarose) e submetidos a temperaturas de 4, 10, 15, 30 e 40°C. Os menores valores de atividade de água capazes de permitir o crescimento de qualquer uma das 5 linhagens estudadas, nas referidas temperaturas, foram 0,93; 0,93; 0,91; 0,92 e 0,95, quando o NaCl foi empregado. Na utilização do glicerol e sacarose, os resultados encontrados foram para o primeiro de 0,94; 0,93; 0,91; 0,90 e para o segundo 0,92 e 0,94; 0,94; 0,92; 0,93 e 0,94, respectivamente.

O uso desses mesmos umectantes também foi descrito no trabalho realizado por NOLAN et al. (1992), ao testarem diferentes atividades de água no crescimento e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*. Neste experimento as soluções de caldo de soja tripticase com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE) tiveram seus níveis de atividade de água diferenciados pela adição de NaCl, sacarose e glicerol. Os resultados observados permitiram afirmar que tanto a *Listeria monocytogenes* como a *Listeria innocua* são capazes de crescer em meios com atividade de água mais baixos, quando contendo glicerol do que em meios com NaCl e sacarose, onde os dados obtidos foram 0,90; 0,92 e 0,92, respectivamente, os quais estão de acordo com o trabalho desenvolvido por TAPIA de DAZA et al. (1991). A sobrevivência foi menor quando os meios continham NaCl, para ambas as bactérias estudadas.

A aeração é um outro fator que deve ser levado em conta, quando se estuda o desenvolvimento de um microrganismo. Por isso, GEORGE & LUND (1992) ao verificarem que na literatura existiam controvérsias sobre este assunto, desenvolveram um trabalho, para determinar a influencia da aeração e de dois meios de cultura no crescimento de duas linhagens de *Listeria monocytogenes* a um pH 4,5 e a uma temperatura de 20°C. Diante dos resultados encontrados, foi possível constatar que nas condições utilizadas o crescimento desta bactéria foi mais rápido em cultivos na presença de oxigênio, do que naqueles sob atmosfera controlada de nitrogênio. Foi observado também, que o caldo de soja tripton

suplementado com extrato de levedura e glicose (TSYGB) possibilitou um maior crescimento do que no caldo triptose fosfato (TPB).

O crescimento da *Listeria monocytogenes* Scott A foi também estudado em caldo triptose fosfato (pH 4,5) por BUCHANAN e KLAWITTER (1990) com o objetivo de se conhecer os efeitos e interações entre a temperatura de incubação e atmosfera circundante. Para realização deste experimento, o microrganismo foi cultivado em condições de aerobiose e anaerobiose e incubado à temperaturas de 5, 10, 19, 28 e 37°C, depois da inoculação de 10^3 UFC/ml. O crescimento em aerobiose não foi observado para temperaturas de 5 e 10°C, porém, as células sobreviveram por longos períodos nestas temperaturas. Foi constatado também que a bactéria cresceu a 19 e 28°C e não a 37°C, onde a morte das células ocorreu rapidamente. Nas condições de anaerobiose, resultados similares foram observados para temperaturas de 5, 10, 19 e 28°C, apesar de ter aumentado a taxa de crescimento a 19°C. Nesta condição, também foi verificado que a 37°C, depois de um declínio inicial do número de células, houve recuperação das mesmas, que cresceram até o nível do inóculo inicial. Tendo em vista estes resultados, os autores concluíram que, sob condições apropriadas, a *Listeria monocytogenes* pode crescer a níveis de pH tão baixo quanto 4,4 e que, se o oxigênio estiver restrito, o microrganismo tem a capacidade de recuperar as lesões fisiológicas associadas a injúria ácida.

O efeito combinado de atmosfera modificada, nisina e um produto de fermentação de bactérias ácido-láticas denominado de ALTA™ 2341 (possui um componente antimicrobiano, não especificado pelo fabricante-Quest International) foi utilizado no controle de *Listeria monocytogenes* por SZABO & CAHILL (1998). O caldo triptona de soja (pH 6,0) foi utilizado como meio de crescimento desse patógeno e a incubação foi realizada a 4°C, por 21 dias e a 12°C, por 7 dias. Foi constatado que o uso 100% de CO₂ inibiu fortemente a *Listeria monocytogenes*, embora um aumento de 5 ciclos logarítmicos tenha sido observado, em todas as atmosferas utilizadas (ar, 100% de N₂, 40% de CO₂: 60% de N₂ ou 100% de CO₂), depois de 7 dias à 12°C. Quando a temperatura aplicada foi 4°C,

ocorreu um aumento de 4 a 5 ciclos logarítmicos na população de *Listeria monocytogenes*, quando mantidas em ar, 100% de N₂ e 40% de CO₂: 60% de N₂, durante os 21 dias. Porém, não houve crescimento quando 100% de CO₂ foi utilizado. Na presença de nisina (400UI/ml), ocorreu um aumento da fase lag em todas as atmosferas estudadas a 12°C. A 4°C, esse efeito foi mais pronunciado em todas as atmosferas, com exceção de 100% de CO₂. Com o aumento da concentração de nisina (1250UI/ml), a *Listeria monocytogenes* foi inibida em todas as combinações de atmosferas a 4 e 12°C. A 4°C quando 0,1% de ALTA™ 2341 e 100% de N₂ foram combinados, a população teve um aumento de 3 ciclos logarítmicos. O aumento da concentração de ALTA™ 2341 para 1% resultou na diminuição da população abaixo dos níveis de detecção, dentro de 24 horas, em todas as combinações de atmosferas e temperaturas. Foi observado também, que na presença de 1% de ALTA™ 2341, em todas as atmosferas estudadas à 12°C, ocorreu um crescimento de *Listeria monocytogenes* enquanto que, a 4°C, esse crescimento foi obtido na presença de ar ou 100% de N₂. Desta forma, os autores chegaram a conclusão que o crescimento de *Listeria monocytogenes* poderia ser controlado somente quando fosse utilizado 100% de CO₂ e 1,0% de ALTA™ 2341. A combinação de 4°C com 100% de CO₂ controlou adequadamente o crescimento de *Listeria monocytogenes* no sistema estudado (pH 6,0), por longos períodos.

ROSENOW & MARTH (1987) com o objetivo de melhor conhecer o comportamento da *Listeria monocytogenes* frente a natureza de alguns alimentos, utilizaram diferentes produtos lácteos como leites (desnatado, integral e achocolatado) e creme de leite, inoculados com 10² e 10³ microrganismos/ml e submetidos a temperaturas de 4, 8, 13, 21 e 35°C. Nestes experimentos, foi observado que apesar das 4 linhagens terem tido um comportamento diferente nos diversos substratos, o tempo de geração diminuiu com o aumento da temperatura de incubação. Cabe ainda ressaltar, que para uma mesma temperatura, a velocidade do crescimento da *Listeria monocytogenes* foi similar em todos os produtos. No entanto, contagens maiores do microrganismo foram registradas no leite achocolatado, para todas as temperaturas estudadas.

Na tentativa de construir modelos preditivos do crescimento de *Listeria*, RAZAVILAR & GENIGIORGIS (1998) realizaram três séries de experimentos, onde foram avaliados os efeitos das concentrações de sorbato de potássio (0,3%), propionato de potássio (0,3%), benzoato de sódio (0,1%), metilparabeno (0,0 a 0,2%) e cloreto de sódio (0,5 a 12,5%) sobre culturas de *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri* e *Listeria innocua* em caldo infusão cérebro coração (BHI - pH > 5,9), à temperatura de 4 e 30° C , por um período de 58 dias. Os dados obtidos revelaram que propionato de sódio, sorbato de potássio e benzoato de sódio permitiram o crescimento de *Listeria monocytogenes* à 4° C, em 18, 27 e 21 dias, respectivamente. O crescimento desse mesmo patógeno também foi verificado à temperaturas, que variaram de 8 a 30° C a pH 6, quando a concentração 12% de NaCl foi utilizada. No entanto, o crescimento de todas as espécies foi inibido na presença de 12,5% de NaCl. Quando concentrações de 0,1 e 0,2% de metilparabeno foram utilizadas no experimento, as espécies de *Listeria* acima relacionadas iniciaram seu crescimento a 8° C e 30° C, respectivamente.

AHAMAD & MARTH (1989), ao estudarem o comportamento da *Listeria monocytogenes* à 7, 13, 21 e 35°C em caldo triptose, contendo os ácidos acético, cítrico e láctico, verificaram que os mesmos apresentaram um grau de inibição no crescimento dessa bactéria. Sendo assim, os autores concluíram que os 3 diferentes ácidos aumentaram sua eficácia com a queda da temperatura.

A influência de acidulantes e da temperatura no crescimento de *Listeria monocytogenes* Scott A também foi estudada por JUNEJA et al. (1998). Esse microrganismo foi cultivado a 10, 19 e 37°C, até a fase exponencial, em caldo infusão cérebro coração (BHI). Determinados volumes de BHI antes de serem inoculados foram acidificados com ácido acético e ácido láctico até atingirem pH de 5,4 e 7,0, para cada ácido estudado. Subsequentemente, as células foram aquecidas a 60°C, para verificar o tempo de morte térmica (valor D) desse patógeno. A contagem do número de *Listeria monocytogenes*

sobrevivente foi realizada em ágar de soja tripticase suplementado com 0,6% de extrato de levedura e 1% de piruvato de sódio. Foi constatado que, independente do ácido utilizado, os valores D diminuíram significativamente com o aumento da temperatura de crescimento, quando o pH do BHI foi 5,4. No entanto, os valores D aumentaram com aumento da temperatura a pH 7,0. Em pH 5,4, ajustado com ácido láctico, os valores D em minutos foram 1,30; 1,22 e 1,14 para as células crescidas a 10, 19 e 37°C, respectivamente. Nesse mesmo pH, quando o caldo BHI foi ajustado com ácido acético, as células de *Listeria monocytogenes* não cresceram a 10° C e os valores D foram 1,32 e 1,22 para temperaturas de 19°C e 37° C, respectivamente. Quando o caldo BHI foi ajustado a um pH 7,0 com ácido láctico, os valores D em minutos foram $D_{10^{\circ}\text{C}}=0,95$, $D_{19^{\circ}\text{C}}=1,12$ e $D_{37^{\circ}\text{C}}=1,28$; entretanto, quando o ajuste foi realizado com ácido acético, foram obtidos $D_{10^{\circ}\text{C}}=0,83$, $D_{19^{\circ}\text{C}}=0,93$ e $D_{37^{\circ}\text{C}}=1,11$. Portanto, as condições de crescimento afetaram a resistência térmica de *Listeria monocytogenes* assim como a composição dos ácido graxos da membrana da célula.

Do atual estágio de conhecimento, pode-se concluir que não existem dentro dos parâmetros de crescimento, pontos fixos para o desenvolvimento e/ou sobrevivência de *Listeria monocytogenes*. Todos os fatores que interferem no desenvolvimento (pH, temperatura, a_w , concentração de sal, etc.) interagem entre si e são interdependentes. Todavia, de acordo com os estudos acima relacionados, pode-se deduzir que esta bactéria é incapaz de crescer em valores de pH igual ou inferiores a 4,0; desenvolve-se a a_w superiores a 0,90; resiste a altas concentrações de NaCl, podendo crescer quando a mesma for de 10%; cresce tanto em aerobiose como em anaerobiose e em ampla faixa de temperatura.

2.7. Métodos de detecção, identificação e enumeração de *Listeria monocytogenes*

O isolamento, detecção e enumeração da *Listeria monocytogenes* não é até hoje uma tarefa fácil de se realizar. Frente aos problemas encontrados, os pesquisadores vem dispensando inúmeros esforços no desenvolvimento de diferentes meios de cultivo e de novas técnicas de aplicação. Dentre as metodologias aplicadas, encontram-se a semeadura

direta, o enriquecimento da amostra seguido por semeadura em ágar seletivo e os métodos rápidos.

O semeadura direta envolve alguns problemas como: o crescimento de outros microrganismos no meio estudado, o não crescimento de bactérias presentes em pequenas quantidades e de microrganismos injuriados (DONNELLY et al., 1992). Por isto, alguns trabalhos realizados (DOYLE & SCHOENI, 1987; SLADE & COLLINS-TOMPSON, 1987; RYSER & MARTH, 1987e; RYSER & MARTH, 1987f e RYSER & MARTH, 1989) exploraram a capacidade de multiplicação desta bactéria à temperatura de 4°C em meios de enriquecimento não seletivos por longos períodos eliminando, deste modo, a presença de organismos não psicrotróficos e, simultaneamente, possibilitando a multiplicação de células debilitadas de *Listeria monocytogenes* e/ou as que se encontram em baixos números nas amostras. No entanto, é importante ressaltar que, apesar desta técnica de enriquecimento a frio apresentar-se eficiente na detecção desta bactéria, este procedimento se torna impraticável para o uso rotineiro em laboratórios ou para investigações de alimentos envolvidos em surtos, devido a necessidade de um longo período de incubação (RYSER & MARTH, 1991a).

Na tentativa de minimizar o problema, alguns meios de enriquecimento foram formulados com agentes seletivos tais como: ácido nalidixico, acriflavina e ciclohexamida; adicionados ou não de antibióticos, permitindo desta maneira, a redução do tempo necessário à incubação. Entretanto, atenção especial deve ser dirigida ao fato que muitos agentes seletivos podem inibir o crescimento do patógeno estudado, especialmente quando o mesmo estiver injuriado (DONNELLY et al., 1992; LOVETT, 1988 e RYSER & MARTH, 1991a).

Inúmeras pesquisas têm sido direcionadas para otimização dos métodos rápidos visando atender a crescente demanda, principalmente por parte das indústrias de alimentos, para isolamento e detecção rápida dos microrganismos patogênicos. Além da rapidez, como

o próprio nome demonstra, estes métodos visam atender especificidade, sensibilidade e preço acessível. Entre os métodos atualmente empregados encontram-se: Reação em cadeia de polimerase (PCR); Sondas de DNA; Sistema de Imunocaptura, Método de Tubos Fung-Yu e Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

Dentre os métodos convencionais para isolamento e detecção da *Listeria monocytogenes* destacam-se o do "Food and Drug Administration" (F.D.A.) e o do "U.S. Department of Agriculture" (U.S.D.A.), tendo sido o primeiro desenvolvido para aplicação em laticínios, enquanto o segundo foi para produtos cárneos.

O método do F.D.A. foi primariamente desenvolvido por LOVETT et al. (1987) e após algumas modificações nos anos que se seguiram, foi revisado pela última vez por HITCHINS (1992). Este método consiste na mistura da amostra com caldo de enriquecimento (EB) seguido por incubação durante 24 a 48 horas. Decorrido este período, procede-se o esgotamento em meios seletivos tais como, ágar cloreto de lítio fenil etanol moxalactam (LPM) e meio Oxford (OXA), sendo logo a seguir incubados a temperaturas de 30 e 35°C respectivamente por 24 a 48 horas. As colônias crescidas em LPM e consideradas suspeitas, devem ser examinadas a luz oblíqua transmitida (iluminação de Henry), podendo ser identificadas como *Listeria* as que apresentarem cor azul brilhante ou branca. No meio OXA, estes mesmos microrganismos devem formar colônias pretas com halo escuro. Em uma etapa posterior, colônias típicas provindas tanto do OXA como do LPM devem ser semeadas por esgotamento em ágar não seletivo (ágar de soja tripticase com 0,6% de extrato de levedura-TSAYE), incubadas a 30°C por 24 a 48 horas e, submetidas a confirmação, através de provas bioquímicas e reações hemolíticas (DEVER et al., 1993 e HITCHINS, 1992).

Considerando que, a identificação através de provas bioquímicas leva de 2 a 5 dias de análise, foram desenvolvidos kits bioquímicos para acelerar a obtenção dos resultados. Entre os sistemas para identificação rápida para *Listeria* encontram-se: API 20 STREP, API

ZYME, MICRO ID, API 50 CH, MAST ID, MICRO-ID LISTERIA e API LISTERIA. Os 5 primeiros, por serem menos sensíveis, identificam até o nível de gênero, enquanto que o MICRO ID LISTERIA processa a identificação até espécies, em 24 horas. O API LISTERIA, destaca-se como o mais sensível, chegando até a identificação de subespécies, utilizando para isto um total de 10 testes que incluem: diferenciação entre *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes*, baseados na presença ou ausência de arylamidase (teste DIM), hidrólise da esculina, presença de α -manosidase e produção de ácido a partir de D-arabitol, D-xilose, L-ramnose, α -metil D-glucosídeo, D-ribose, glucose-1-fosfato e tagatose (BILLE et al.,1992 e DEVER et al., 1993)

Nos últimos anos, como o isolamento, detecção e identificação da *Listeria monocytogenes* tornaram-se meta de muitos pesquisadores, um grande número de trabalhos científicos foram publicados. Para constatar a eficiência das metodologias aplicadas, alguns estudos de comparação entre diferentes técnicas foram desenvolvidos em amostras de alimentos, conforme se descreve a seguir:

WARBURTON et al. (1992), para detectarem a presença de células estressadas e as que se encontram em baixos níveis, em amostras ambientais e de alimentos, realizaram um estudo comparativo das versões modificadas dos métodos F.D.A. (1988) e U.S.D.A. (1989). Para isto, em ambos os procedimentos foram utilizados o ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM), o meio Oxford modificado (MOX), o meio Palcam (PAL) e o meio Oxford (OXA) como meios seletivos, assim como o Caldo Fraser modificado (MFB) para o enriquecimento secundário. Os autores concluíram que os métodos F.D.A. e U.S.D.A. modificados não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) porém, quando comparados aos métodos originais, foram significativamente ($p < 0,05$) mais eficientes na recuperação de células. A comparação entre os meios de enriquecimento mostrou que o pH no caldo de enriquecimento do U.S.D.A. (LEB#1) manteve-se mais próximo a neutralidade, favorecendo o isolamento de microrganismos, principalmente os injuriados de alimentos. A inclusão do MFB aumentou significativamente ($p < 0,05$) a recuperação de *Listeria monocytogenes* em

ambos os métodos. Esta técnica, por ser considerada eficiente no isolamento de *Listeria monocytogenes*, foi incluída como método oficial pelo Compendium de Métodos Analíticos do Canadá (WARBURTON et al., 1991).

WALSH et al. (1998) compararam diferentes meios de enriquecimento para o isolamento de *Listeria monocytogenes* em alimentos, utilizando água peptonada tamponada (BPW) como meio não seletivo e, os meios "University of Vermont" (UVM I e UVM II). Duzentos e vinte e uma amostras de alimentos, comercializados em Dublin, foram analisadas utilizando-se os dois tipos de enriquecimento. *Listeria* spp. foi encontrada em 25,8% das amostras analisadas quando os caldos UVM foram utilizados e em 25,3% das amostras, quando o meio BPW foi empregado. Foi verificado também, que *Listeria monocytogenes* estava presente em 14,9% das amostras enriquecidas com os caldos UVM e em 13,1% das enriquecidas com BPW. Deste modo, os pesquisadores concluíram que os caldos UVM foram eficientes na recuperação de *Listeria* spp.

Um estudo comparativo de dois meios de enriquecimento para detecção de *Listeria monocytogenes* em leite cru e produtos de laticínios, também foi realizado por VLAEMYNCK & MOERMANS (1996). Nesse experimento, foram utilizados o caldo de enriquecimento (EB), recomendado pela Federação Internacional de Laticínios dos Estados Unidos (IDF) e pelo "Food and Drug Administration (FDA)" e, o caldo Frasier como enriquecimento seletivo. A detecção e identificação de *Listeria* spp. foram realizadas de acordo com as normas do IDF e a técnica da reação em cadeia de polimerase. Os resultados demonstraram que, estatisticamente, o caldo Frasier foi mais eficiente na recuperação de *Listeria* spp. (26 a 21%) e *Listeria monocytogenes* (9 a 1,4%) nas amostras de queijos analisadas. Entretanto, para as amostras de leite, não houve diferença significativa entre EB e caldo Frasier. Os pesquisadores também concluíram, que a combinação dos dois meios de enriquecimento, resultou em aumento da recuperação de células dos produtos analisados.

HAYES et al. (1992) realizaram a comparação de três métodos de enriquecimento ("Food and Drug Administration" - F.D.A., U. S. "Department of Agriculture" - U.S.D.A. e "Netherlands Government Food Inspection Service"- NGFIS) para o isolamento de *Listeria monocytogenes* em 899 amostras de alimentos refrigerados causadores de listerioses. Como resultado, eles verificaram 121 amostras positivas para o microrganismo pesquisado em pelo menos um método. O isolamento desse microrganismo foi significativamente melhorado pela combinação dos 2 métodos, com resultados de 87% (N.G.F.I.S.-F.D.A.), 88% (U.S.D.A.-F.D.A.) e 91% (U.S.D.A.-N.G.F.I.S.).

HERNAN & RIDDER (1993) testaram 3 diferentes métodos (método clássico, hibridização de DNA, método de reação de cadeia de polimerase - PCR) em 58 amostras de produtos lácteos para detectar a presença de *Listeria monocytogenes*. Neste experimento, os pesquisadores puderam observar que o método clássico de detecção (enriquecimento seguido por plaqueamento em ágar seletivo, mais testes confirmativos) e o método de hibridização de colônias foram equivalentes para todas as amostras testadas; já o método PCR apresentou resultados falso-negativos quando 3 culturas enriquecidas, oriundas de queijos, foram estudadas. No entanto, a técnica do PCR, quando utilizada para água de lavagem de queijos, apresentou alto grau de sensibilidade. Como esta técnica trabalha com amplificação de DNA, ela é capaz de detectar células vivas e mortas, o que vem a ser um problema quando se deseja apenas detectar células viáveis.

A eficiência das técnicas de detecção da *Listeria monocytogenes* também foi verificada por NIEDERHAUSER et al. (1993) que compararam dois diferentes procedimentos e três diferentes tipos de análise: plaqueamento seletivo, ensaio de hibridização comercial (GEN-PROBE) e reação em cadeia de polimerase (PCR), em amostras de queijos macios e semi-macios, depois do enriquecimento. Quando foi utilizado apenas um meio de enriquecimento, a especificidade na detecção desta bactéria para GEN-PROBE foi de 88% ou mais, enquanto que para o plaqueamento seletivo e "PCR", esta taxa foi de 100%. Quanto à sensibilidade, os dados mostraram que a maior taxa foi de 75% para PCR. Usando-se dois

meios de enriquecimento, a especificidade para as três técnicas testadas foi alta, 90% ou mais. A sensibilidade para o plaqueamento seletivo e GEN-PROBE foi de 83 e 33%, respectivamente, enquanto que para o PCR, a sensibilidade obtida foi de 100%. Diante destes dados, os autores chegaram a conclusão que a técnica do PCR, utilizando dois meios de enriquecimento, é uma maneira eficiente para a detecção de *Listeria monocytogenes* em queijos macios e semi-duros.

NIEDERHAUSER et al. (1992) utilizaram reação em cadeia de polimerase (PCR) para detectar a presença de *Listeria monocytogenes* em alimentos. Neste estudo, foram utilizados dois procedimentos. O procedimento A foi baseado na diluição de enriquecimento, seguido pela lise de bactérias e análise direta do lisado por PCR. O procedimento B utilizou a centrifugação do concentrado bacteriano seguido pela lise das células e PCR. Quando foi aplicado o procedimento A em alimentos artificialmente contaminados, o limite de detecção inicial para todas as amostras, com exceção da carne, foi maior do que 10 UFC/10g de alimentos. No entanto, quando 330 amostras de alimentos naturalmente contaminados foram testados pelo método clássico e por análise de PCR, 20 amostras apresentaram-se positivas para ambos os métodos citados. Das amostras previamente referidas, 100 foram selecionadas para serem analisadas pelo procedimento B e comparadas tanto com o procedimento A, como também, com o método clássico de cultura. Todas as amostras positivas para *Listeria monocytogenes* no procedimento A foram também detectadas pelo procedimento B, apesar deste último apresentar como vantagem a detecção desse organismo em uma amostra a mais.

A análise através da cadeia de polimerase (PCR) foi utilizada por ROSSEN et al. (1991) para identificação da *Listeria monocytogenes* em culturas puras e em amostras de 25 g de alimentos (queijos macios e em saladas preparadas com maionese), as quais foram homogeneizadas com 225 ml de caldo de enriquecimento com *Listeria* e incubados a 37°C, por 40 horas. Esta metodologia também foi testada com sucesso, para aproximadamente 40 amostras de carne. A técnica provou ser específica para a identificação de *Listeria*

monocytogenes, sendo capaz de detectar esta bactéria em 3,5 horas, em contagens de 2×10^5 UFC/ml em caldo de cultura seletivo.

Apesar do método de detecção baseado no PCR ser considerado sensível e específico para a rápida identificação de *Listeria monocytogenes*, ele pode produzir resultados falso-positivos em decorrência da amplificação do DNA presente nas células mortas. Sendo assim, KLEIN & JUNEJA (1997) desenvolveram um novo método baseado na amplificação do mRNA, pela tecnologia de transcrição reversa-PCR (RT-PCR). O método depois de ser validado em carne cozida, inicialmente contaminada com 3UFC/g, comprovou ser sensível para a detecção de células viáveis de *Listeria monocytogenes* e indicado para detecção desse patógeno para diversos alimentos.

Uma outra técnica denominada de separação imunomagnética (IMS) foi utilizada por WIECKOWSKA et al. (1999) para determinar a especificidade e a sensibilidade desse método frente a *Listeria spp.*, presente em alimentos artificialmente contaminados. A técnica apresentou-se eficiente na detecção dessa bactéria (injurizada pelo calor) e sua sensibilidade foi de 1UFC/25g de alimento.

Em queijos há normalmente a presença de outros microrganismos, especialmente bactérias ácido lácticas do gênero *Lactococcus*, gerando certa dificuldade em determinar *Listeria spp.*, em função da similaridade da morfologia das colônias, apresentadas por esses microrganismos. Desse modo, GARZAROLI & RONDININI (1992) estudaram a capacidade de recuperação desta bactéria em quatro meios comerciais seletivos. Como resultado, os pesquisadores observaram que o meio de ágar *Listeria* McBride Modificado (MMA) e o meio de Ágar Vogel Johnson Modificado (MVJ) não foram eficientes para enumeração de *Listeria spp.*. O meio MMA permitiu o crescimento de outros microrganismos e o meio MVJ foi excessivamente seletivo, inibindo algumas espécies de *Listeria* e seu crescimento. A identificação das colônias de *Listeria* nos meios Oxford e Agar Palcam foi extremamente difícil, devido a presença de altas concentrações de *Lactococcus*.

No entanto, após a verificação das colônias suspeitas, através do estereoscópio e, posterior transferência para dois diferentes meios de caldo de soja tripticase suplementado com extrato de levedura (TSYEB) e TSYEA com adição de manitol, foi possível a diferenciação de colônias de *Listeria*. Microrganismos que cresceram em TSYEB foram submetidos às provas bioquímicas (motilidade, reação de catalase e teste sorológico) no meio TSYEA com manitol, nenhuma modificação de cor ocorreu e também nenhum halo se formou na presença da colônia de *Listeria*. Análises quantitativas nas amostras de queijo foram realizadas através de plaqueamento em meio Oxford e Ágar Palcam.

A avaliação da eficiência de quatro meios de plaqueamento no isolamento de *Listeria spp.* foi estudado por FURLANETTO et al. (1996). Através dos experimentos realizados com 30 amostras de queijos, os pesquisadores constataram que os meios Palcam e MOX, comportaram-se igualmente no isolamento de *Listeria monocytogenes*. Nos meios anteriormente referidos, esse patógeno foi isolado apenas 1 vez (3,3%) de cada um dos meios enquanto, no meio MVJ e em *Listeria selective agar base-ciclohexamida, acriflavina, ácido nalidixico (LSAB-CAN)*, a *Listeria monocytogenes* ocorreu 2 vezes, em cada um dos meios. Os pesquisadores sugeriram a utilização de mais de um meio seletivo de isolamento para a pesquisa de *Listeria spp.*, em alimentos.

A eficiência do ágar MOX e do ágar Palcam no isolamento de *Listeria* em amostras de queijos, também foi avaliada por SILVA et al. (1998). Foram analisadas cento e três amostras de queijos (Minas frescal, Ricota, Gorgonzola, Roquefort, Brie, Camembert e Cheddar), fabricados e comercializados no Rio de Janeiro. O ágar MOX foi mais eficiente no isolamento de *Listeria* do que o ágar Palcam para alimentos mais contaminados, como o queijo Minas frescal. Porém, os dois meios de cultura apresentaram-se similares para o isolamento de *Listeria* em queijos maturados (Gorgonzola e Roquefort).

Segundo CANTONI et al. (1998), um outro meio que poderia ser utilizado para o isolamento de *Listeria spp.* é o ágar sangue. Esse meio, cuja formulação inclui ágar

Columbia (Oxoid) suplementado com eritrócitos de ovelha (5%), cloreto de lítio (10g/l) e alguns antibióticos, foi eficiente no isolamento de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* de alimentos, incluindo queijos.

O ágar sangue para detecção de *Listeria monocytogenes* também foi empregado por JOHANSSON (1998) com a finalidade de verificar sua eficiência, em comparação com o ágar seletivo para *Listeria* (LA). O ágar Trypticase de soja foi suplementado com sangue de ovelha (5%), cloreto de lítio (10g/l), sulfato de polimixina B (10mg/l) e ceftazidina (20 mg/l) (LMBA) enquanto, ao LA foi adicionado cloreto de lítio (15g/l) e ceftazidina (15g/l). Depois do enriquecimento, o LMBA apresentou-se superior ao LA tanto na detecção, como também, na enumeração de *Listeria monocytogenes*. O meio LMBA também apresentou vantagem quando comparado aos meios Oxford e Palcam por apresentar β -hemólise. Por outro lado, os outros meios de cultura forneceram resultados falso-positivos por causa do crescimento de outras espécies de *Listeria*.

Para verificar o comportamento da *Listeria monocytogenes* durante a fabricação e maturação de queijos semi-duros, DOMINGUEZ et al. (1987) realizaram o processamento destes produtos, utilizando leites provenientes de ovelha, de cabra e de vaca (15:35:50) e inóculos de $1,9 \times 10^5$ e $4,0 \times 10^3$ microrganismos/ml. A quantificação do número de células foi realizada no leite, no coágulo, no soro e nos de queijos. Para amostras sólidas, quantidades de 10g foram adicionadas a garrafas contendo 10ml de água peptonada (1%) e 0,1% de Tween 20, onde se procedeu a redução das partículas através de uma espátula estéril. Após diluições, foi realizado o plaqueamento em Ágar Listeria Seletivo (LSAM) à 37°C, por um período de 48 horas. Para identificação de *Listeria*, as placas de LSAM foram examinadas em estereoscópio com luz incidente, para verificação da morfologia da colônia, seguido pela identificação bioquímica das mesmas. Desse modo, foi possível constatar a presença destas bactérias durante o processamento e maturação dos queijos.

Para detecção de *Listeria monocytogenes* em queijos inoculados com fungos (Gorgonzola e Adelist) e não inoculados (queijos macios comercializados), WAAK et al. (1999) fizeram a comparação entre os métodos da Federação Internacional de Laticínios (IDF Standard) com o método da Proposta Padrão Internacional (ISO). Apesar do método ISO ter sido mais eficiente do que o método IDF para os queijos Gorgonzolas analisados, ambas as metodologias mostraram-se sensíveis para os queijos Adelist e queijos macios comercializados. Quando os pesquisadores realizaram um experimento para verificar quais dos dois meios seletivos de isolamento, Palcam ou Oxford, recuperavam melhor *Listeria* spp. constataram que, o meio Palcam apresentou um menor número de microrganismos contaminantes, quando comparado ao ágar Oxford. Desse modo, quando se utilizou o meio Palcam foi mais fácil o isolamento e a identificação de *Listeria* spp. oriundas de queijos.

Em estudos de termorresistência, a recuperação das células sobreviventes ao processo aplicado foi realizada diferentemente nos diversos trabalhos que constam na literatura. Entre os inúmeros artigos disponíveis, apenas alguns se preocuparam com a enumeração da *Listeria monocytogenes* enquanto, a maioria deles se atém a presença ou ausência dessa bactéria.

Assim, BUNNING et al. (1988) estudaram as cinéticas de inativação térmica de *Listeria monocytogenes*, em leite bovino estéril, em diferentes temperaturas (à 52,2; 57,8; 63,3 e 68,9°C). Na recuperação de células, injuriadas pelo calor, utilizaram o plaqueamento direto em ágar de soja tripticase com 0,6% de extrato de levedura (TSAYE) por um período de 48 horas à 37°C e 168 horas à 25°C. Paralelamente, procederam à inoculação dos microrganismos injuriados em caldo de enriquecimento (TSBYE) por 7 dias à 25°C. Depois desse período as células provenientes deste caldo foram plaqueadas, por esgotamento, no 3º, 5º e 7º dia em Ágar Mc Bride *Listeria*, para a confirmação do microrganismo presente. Os resultados indicaram que foi possível detectar maior número de microrganismos à 25°C no período de 168 horas, quando as temperaturas mais elevadas de aquecimento foram empregadas. Foi constatado, também, que o número de amostras positivas, conseguidas

através do método de enriquecimento, foi similar ao obtido pelo procedimento de plaqueamento direto.

BRADSHAW et al. (1985), ao verificarem a resistência térmica da *Listeria monocytogenes* utilizaram tampão fosfato e leite integral estéril inoculados com 1×10^5 células/ml. Para determinação da contagem total, foi empregado o meio de ágar de soja tripticase e 0,6% de extrato de levedura (TSAYE), incubados a 37°C por 48 horas. Para comprovação das colônias de *Listeria* das placas previamente mencionadas, foram selecionadas 10 colônias para realização de provas bioquímicas. Nestes testes, foram observados motilidade, crescimento em forma de guarda-chuva, presença de hemólise em placas, em meio ágar contendo 5% de sangue de cavalo, teste oxidase negativa e catalase positiva. Os resultados indicaram que a metodologia aplicada foi eficiente na identificação das células de *Listeria monocytogenes* sobreviventes ao tratamento térmico.

A resistência térmica da *Listeria monocytogenes* em leite integral estéril também foi pesquisada por DONNELLY et al. (1987). Neste experimento, os autores utilizaram a metodologia descrita pelos "Standard Methods for Examination of Dairy Products" para determinação das células sobreviventes ao processo térmico. O meio utilizado para a enumeração da bactéria foi ágar fosfato triptose (TPA) com adição de 0,05% de esculina e 0,05% de citrato férrico (TPA-FE), seguido por incubação a 37°C por 48 horas. Para confirmação das colônias, foram aplicadas as técnicas de coloração de Gram, motilidade a 22°C e sistema de identificação bioquímica (MINITEK-BBL Microbiology-system), que consistiu nos testes de arabinose, citrato, dextrose, esculina, galactose, lactose, maltose, manitol, melibiose, ramanose, salicina, sacarose, trealose, uréia e xilose. Os resultados indicaram que a esculina e o citrato férrico adicionados ao TPA, facilitaram a visualização das colônias sobreviventes de *Listeria monocytogenes* em placas de Petri, que continham TPA.

No estudo realizado por BECKER et al. (1987), a detecção e enumeração da *Listeria monocytogenes* foram realizadas em queijos e em leite cru. No queijo, 25g de amostra foram homogeneizados com 225 ml de caldo triptose em um "stomacker" por um período de 1,5 a 2 minutos. Terminada a homogeneização, 1 ml foi retirado para diluição em salina peptonada, sendo o restante transferido para um frasco, e suplementado com tripaflavin-HCl, ácido nalidixico e ciclohexamida, e incubado a 30°C por 24 horas. A seguir, procedeu-se a semeadura por esgotamento em ágar de soro ácido de tripaflavina-nalidixico (TNSA). Parte do meio suplementado foi incubado a 4°C para posterior semeadura em TNSA (depois de 1 e 2 semanas e 1 a 2 meses), em condições microaerófilas ou seja 5% O₂, 10% CO₂ e 85% N₂, a 37°C por 48 horas. As colônias crescidas neste meio foram então inoculadas em ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e ágar uréia. Os tubos que apresentaram cor amarela foram, logo a seguir, submetidos a diversas análises (coloração de Gram, catalase, motilidade e reações sorológicas) para confirmação da presença da bactéria estudada. O meio TNSA também foi aplicado para enumeração deste microrganismo, quando foram utilizados volumes de 0,1 ml das diluições acima mencionadas, seguido por incubação e confirmação como previamente referido. Quanto ao leite, quantidades de 25 ml de amostras foram adicionadas a 225 ml de caldo triptose, de onde foram retirados 0,1 ml para o plaqueamento em TNSA. As análises subsequentes (detecção, enumeração e confirmação) seguiram a mesma metodologia aplicada ao queijo. Dessa forma, BECKER et al.(1987) avaliaram a técnica utilizada para detecção e enumeração afirmaram que o crescimento da *Listeria*, em meio de enriquecimento a 30°C pode ser eliminado pela flora competitiva e/ou as colônias deste microrganismo podem ser ocultadas pelo grande número de competidores em meio seletivo TNSA.

2.8. Nisina como agente antimicrobiano

2.8.1. Definição, composição química e característica.

A nisina é um polipeptídeo antibacteriano produzido por certas linhagens de *Lactococcus lactis* (DAVIES et al., 1998), cujo nome é derivado do termo "N-inhibitory substances"(NIS) adicionado ao sufixo INA. De acordo com HARRIS et al. (1992), esta bacteriocina foi descrita pela primeira vez por ROGERS (1928), como uma substância inibidora do crescimento do *Lactobacillus bulgaricus*. Posteriormente, chegou-se a conclusão de que a mesma previne o crescimento de bactérias Gram-positivas e o crescimento de esporos de *Clostridium* e de *Bacillus* (KLAENHAMMER, 1988; DELVES-BROUGHTON, 1990a).

Na literatura o termo nisina é empregado para cinco polipeptídeos, designados como Nisinas: A, B, C, D e E; onde entre elas acredita-se que a Nisina A, por degradação, dá origem as demais (HURST, 1983; HARRIS et al., 1992). Desta forma, estudos sobre a estrutura molecular da Nisina-A, realizados por GROSS e MORELL (1971) revelaram que a mesma é um peptídeo composto de 34 aminoácidos com 3354 Daltons, incluindo um resíduo de dehidroalanina, dois resíduos de dehidrobutireno, uma lantionina e quatro metil-lantioninas, como mostra a Figura 2 (EAPEN et al., 1983; DELVES-BROUGHTON, 1990a ; HARRIS et al., 1992). A Nisina-B apesar de ser tão ativa quanto a anterior, diferencia-se da mesma por apresentar como produto de degradação 32 aminoácidos (HARRIS et al., 1992). Com respeito às outras nisinas, apesar das mesmas serem bioquimicamente relacionadas e apresentarem similar atividade antimicrobiana, sua sequência de aminoácidos ainda permanece desconhecida (HOLLEY, 1981; HARRIS et al., 1992)

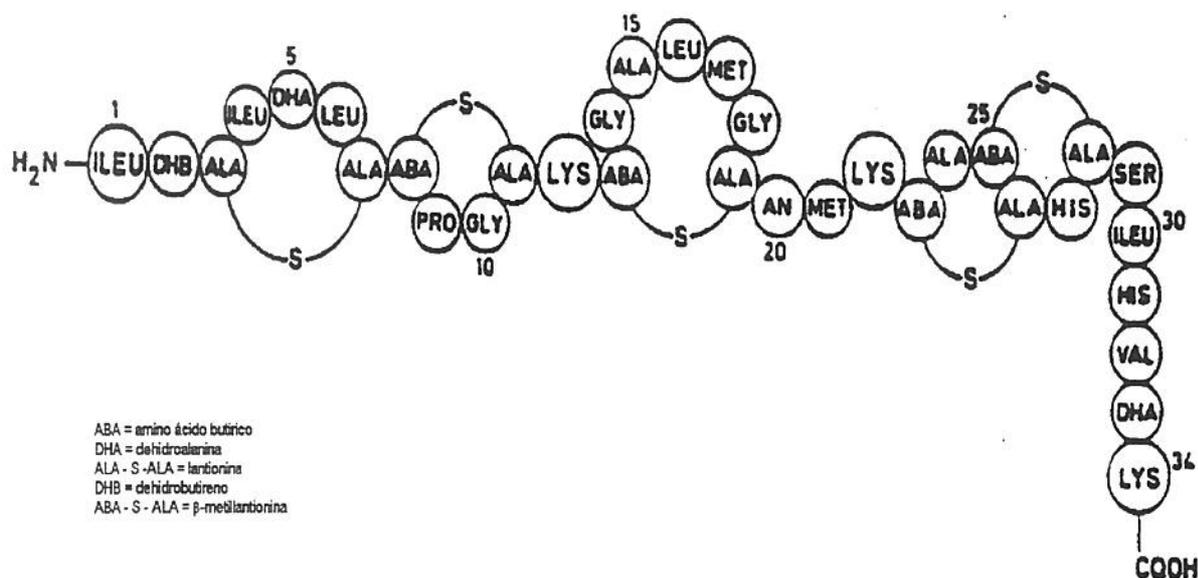


Figura 2. Estrutura da nisina.

Fonte: DELVES-BROUGHTON (1990a)

Comercialmente, a nisina produzida pela "Applin e Barrett" recebe a denominação de Nisaplin, cuja composição foi definida por FOWLER (1979): Nisina (1,026 UI/mg), cloreto de sódio (74,7%), proteína (17,12%), umidade (1,7%), carboidratos (59,3%), gorduras (traços), chumbo (0,15 ppm), arsênio (< 0,5 ppm), zinco (9,2 ppm) e cobre (0,5 ppm). Este concentrado é atualmente comercializado no Brasil pelo Grupo B.V., sendo considerado por DELVES-BROUGHTON (1990a) como bactericida.

No que diz respeito às características desta bacteriocina pode-se dizer que a mesma possui grande estabilidade em condições ácidas (DELVES-BROUGHTON, 1990 a,b), podendo resistir ao processo de autoclavagem, em pH igual a 2, sem que ocorra sua inativação (HURST, 1981 apud LIU & HANSEN, 1990). DAVIES et al. (1998) em seu estudo sobre o efeito do pH na estabilidade da nisina afirmaram que uma solução de 10000

UI/ml foi estável a pH 3 durante a autoclavagem (121°C/15minutos), com perda de menos de 5% de sua atividade. Por outro lado, a pH 2, foi observado perda de 28,5% de sua atividade, quando o processo utilizado foi a 115°C/ 20 minutos e, perda de 47,5% quando o tratamento aplicado foi a 121°C/15 minutos. De acordo com KLAENHAMMER (1988), a nisina, em condições de meio ácido, resiste ao aquecimento de 100°C por um período de 10 minutos, sendo também resistente ao tratamento da pronase e tripsina e inativada pela α quimi tripsina. Um outro fator de destaque, citado por JAY (1992), é que a nisina não contribui para os denominados "off-flavor" e "off-odors".

2.8.2. Ação da nisina

O conhecimento e o modo de ação da nisina tornam-se a cada dia, um dos aspectos mais importantes e um pré-requisito indispensável para sua efetiva aplicação na tecnologia de alimentos (HENNING et al., 1986b). Neste sentido, inúmeras pesquisas têm sido realizadas tanto com esporos como com células vegetativas (MORRIS et al., 1984; RUHR & SAHL, 1985; BENKERROUM & SANDINE, 1988; LIU & HANSEN, 1990; GAO et al., 1991; HARRIS et al., 1991; HARRIS et al., 1992; BRUNO et al., 1992; STEVEN et al., 1992; WINKOWSKI et al., 1994; ABEE et al., 1995; MURIANA, 1996; UKUKU & SHELEF, 1997; WAITE & HUTKINS, 1998; WAITE et al., 1998).

De acordo com HURST (1983), relatos sobre a ação da nisina foram descritos por HIRSCH (1954) que afirmou que essa bacteriocina forma um complexo com os microrganismos. Anos mais tarde, RAMSEIER (1960) descreveu que a nisina atua como um detergente catiônico sobre a superfície celular, promovendo a ruptura das células sensíveis e, como consequência, a liberação do material citoplasmático.

Em estudos realizados por RUHR & SAHL (1985) sobre o modo de ação da nisina na membrana plasmática de algumas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus cohnii* 22,

Bacillus subtilis W23, *Micrococcus luteus* ATCC 4698 e *Streptococcus zymogenes* 24) e em vesículas fosfolipídicas artificiais foi observado que, em ambos os casos, ocorreu o efluxo de componentes celulares de baixo peso molecular tais como aminoácidos e cátions e, conseqüentemente, ocorreu também um colapso do potencial de membrana, fazendo com que os autores assumissem que o gradiente iônico tivesse sido afetado. Resultados similares foram descritos por GAO et al. (1991) ao pesquisarem o efeito da nisina em lipossomos, mostrando que esta bacteriocina, ao se incorporar na membrana plasmática faz com que esta se torne permeável a íons e, conseqüentemente, altere tanto o potencial de membrana como também o gradiente de pH. Dados confirmativos da pesquisa realizada por GAO et al. (1991) foram obtidos por BRUNO et al. (1992), que verificaram a influência da nisina na exaustão da força motiva do próton (PMF) em células de *Listeria monocytogenes* Scott A, cujos valores de pH externos testados foram de 5,5 e 7,0. Nestas condições, a adição da nisina em concentrações maiores ou iguais a 5 µg/ml, dissipou completamente o gradiente de pH e o potencial de membrana. Foi verificado também que à concentrações de 1,0 µg/ml, o gradiente de pH foi completamente dissipado. A resposta obtida para o potencial de membrana variou em relação ao pH externo utilizado, ou seja, para o pH igual a 5,0, ocorreu pequena diminuição do potencial de membrana, enquanto que para o pH igual a 7,0, o resultado desta redução foi mais pronunciado. Ao concluir este trabalho, os autores afirmaram que a ação da nisina sobre "PMF" da bactéria estudada, mostrou-se dependente tanto da concentração como do tempo de aplicação desta bacteriocina.

WINKOWSKI et al. (1994), estudaram a morte das células de *Listeria monocytogenes* Scott A expostas à ação da nisina e apresentaram evidências de que as mesmas promovem o efluxo de ATP, reduzem a concentração de ATP intracelular e dispersam a força motiva do próton (PMF). Os pesquisadores também sugeriram que a nisina rompe a barreira celular com a formação de poros, permitindo o efluxo de prótons e outras moléculas menores. Essa hipótese foi confirmada por WAITE et al. (1998) que mostraram que a nisina e outras bacteriocinas induzem a hidrólise ou efluxo de ATP, fosfato inorgânico (Pi) e fosfoenolpiruvato (PEP), tendo como conseqüência a inibição do sistema

de transporte de glucose em diversas linhagens de *Listeria monocytogenes*. Além disso, a nisina também provoca o efluxo de AMP e ADP, como demonstrado nos experimentos realizados por WAITE & HUTKINS (1998).

Em células Gram negativas intactas não se observa a ação de nisina, porém, quando as membranas externas das mesmas são rompidas através de choque osmótico ou formação de vesículas na membrana citoplasmática ou ainda por procedimentos que afetam o componente lipopolissacarídeo, elas tornam-se sensíveis a nisina (GAO et al., 1991, HARRIS et al., 1992, KALCHAYANAND et al., 1992; CARNEIRO-DE-MELO, 1996).

A ação da nisina sobre esporos foi descrita por O'BRIEN et al. (1956), que pesquisaram o efeito das bacteriocinas para preservação dos alimentos. Para tanto, foi empregado a subtilina e a nisina na determinação da resistência térmica de microrganismos termófilos. Dessa forma, os autores observaram que o número de esporos de *Bacillus stearothermophilus*, quando submetidos a concentração de 140 UI de nisina /g de alimento (purê de ervilha), sofreram redução de 30% no valor $D_{121^{\circ}\text{C}}$.

A eficiência da nisina sobre os esporos termófilos também foi confirmada em trabalhos posteriores realizados por HEINEMANN et al.(1965) e EL-SADEK et al. (1976), apud SCOTT & TAYLOR (1981a). De acordo com SCOTT & TAYLOR (1981a), o uso da nisina em alimentos, termoprocessados permite uma diminuição do processo de aquecimento e aumento da vida de prateleira do produto.

A sensibilidade dos esporos injuriados pelo calor à ação da nisina foi também abordado por DELVES-BROUGHTON (1990a), quando analisou o trabalho desenvolvido por LIPINSKA (1977). Este último pesquisador observou uma redução na porcentagem de esporos de *Bacillus stearothermophilus* em crescimento pós germinativo, quando da adição de maiores concentrações de nisina no meio.

Em esporos de *Clostridium botulinum* foi observado que tanto o aumento de temperatura (20-30°C acima da considerada ótima de choque térmico) como também longos períodos de choque térmico, levaram a diminuição da concentração de nisina necessária para impedir a germinação dos esporos, desse microrganismo (SCOTT & TAYLOR, 1981b).

De acordo com EAPEN et al. (1983) e HOLLEY (1981), a inibição pela nisina ocorre no crescimento pós germinativo. Inclusive, HOLLEY (1981) cita que essa bacteriocina atua causando a inibição do entumescimento pré-emergente do esporo. Fato esse confirmado por MOHALLEM (1994), que através do acompanhamento da absorção verificou que concentrações de nisina maiores ou iguais a 50UI/ml inibiram o crescimento pós-germinativo de esporos de *Bacillus stearothermophilus*. HITCHINS et al. (1963) apud GUPTA et al. (1971) e EAPEN et al. (1983) mencionaram que a nisina evita a lise da capa do esporo, mas não a germinação dos esporos de *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*.

Mais recentemente, DELVES-BROUGHTON (1990a) ao descrever o modo de ação da nisina, reafirmou o que foi descrito por HOLLEY (1981), conforme apresentado na Figura 3.

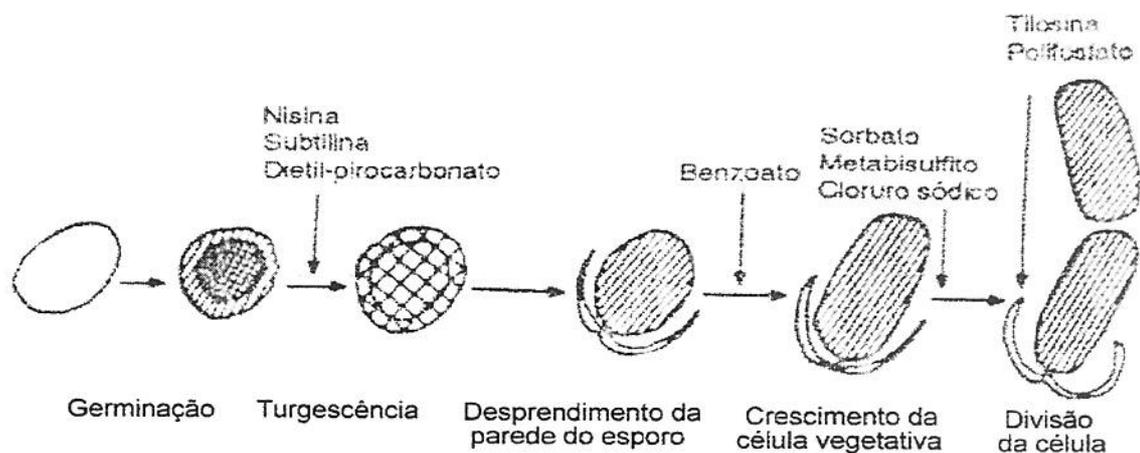


Figura 3. Inibição do entumescimento pré-emergente de esporos pela nisina.

Fonte: DELVES-BROUGHTON (1990a).

Em uma outra pesquisa, LIU & HANSEN (1990) verificaram que os dois fragmentos resultantes, da clivagem da nisina, contendo resíduos de dehidroalanina (DHA) e dehidrobutireno (DHB), foram capazes de inibir a germinação de esporos. No entanto, os resultados das atividades dos dois fragmentos foram pelo menos dez vezes menor do que quando se utiliza a nisina íntegra.

2.8.3. Fatores que afetam a atividade da nisina

Existem alguns fatores importantes que podem afetar a atividade antimicrobiana da nisina, como por exemplo, condições de armazenamento, ação enzimática, pH e temperatura.

Durante a estocagem, podem ocorrer perdas da atividade desta bacteriocina em decorrência da temperatura e tempo de armazenamento, sendo então necessário a aplicação

de diferentes concentrações de Nisaplin (no alimento) para alcançar os diferentes objetivos desejados (FOWLER, 1979 e DELVES-BROUGHTON, 1990a). Em carnes curadas, foi observado que ocorreu um aumento da germinação de esporos de *Clostridium botulinum* após prolongado tempo de armazenamento. Deste modo, a mais plausível explicação deste fato, é que observações realizadas em meio de cultura mostraram que a nisina, vagarosamente se degradou em caldo TPYG armazenado a 35°C (SCOTT & TAYLOR, 1981a).

No que diz respeito à ação enzimática, a nisinase produzida por algumas bactérias, consegue inativar diferentes tipos de nisina (A, B, C e E) constituindo dessa forma, um sério problema na fabricação de queijos, que contém microrganismos produtores desta bacteriocina (HURST, 1983 e KIM, 1993).

O pH exerce um efeito tanto sobre a solubilidade como também sobre a estabilidade da nisina, fazendo com que as duas diminuam com o aumento do pH (HURST, 1983 e LIU & HANSEN, 1990). Baseado nisso, HENNING et al. (1986a) sugeriram que esta bacteriocina tenha aplicação somente em alimentos com pH abaixo de 7,0 e, onde o crescimento de organismos Gram-positivos não é desejado. De acordo com MOHAMED et al. (1984) apud MAISNIER-PATIN et al. (1992), a quantidade de nisina necessária para inibir *Listeria* é 16 vezes menor quando o pH é 5,5 do que a pH 7,4.

A temperatura também é importante na estabilidade da molécula de nisina, que se torna mais vulnerável ao efeito do calor, quando ocorre um aumento no valor de pH. Resultados obtidos por DELVES-BROUGHTON (1990a) revelaram que a porcentagem de retenção de atividade de Nisaplin, em tampão aquecido a 121°C por 15 minutos, mostrou-se dependente do pH, com porcentagens de retenção de 100; 71; 35; 14,5 e 0,5 foram encontradas a pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0, respectivamente.

De acordo com GUPTA et al. (1971) e HENNING et al. (1986), o efeito antimicrobiano pode ainda ser afetado tanto por componentes presentes nos alimentos, como também por aqueles adicionados aos mesmos. No primeiro caso, os pesquisadores ao estudarem os efeitos de ions monovalentes e divalentes na germinação dos esporos de algumas espécies de *Bacillus*, na presença ou ausência de nisina, verificaram que o cobre, o ferro, o manganês e o sódio, quando presentes, potencializam a ação inibitória da nisina, sobre a germinação dos esporos estudados enquanto, o cálcio e o magnésio desempenham o papel oposto. Dando sequência a essa idéia de diminuição do efeito antimicrobiano, HENNING et al (1986a) enfatizaram que a aplicação de agentes emulsificantes em alimentos contribui para a não eficácia da nisina na inibição do *Bacillus coagulans*.

2.8.4. Nisina em alimentos

A idéia da utilização da nisina em alimentos foi sugerida pela primeira vez por HIRSCH (1951), depois de realizar um experimento com linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* na fabricação do queijo suíço, obtendo como resultado a inibição do estufamento tardio causado pelo *Clostridium butyricum* e *Clostridium tyrobutyricum* (HURST,1983; DELVES-BROUGHTON, 1990b e ROBERTS et al., 1992). Posteriormente, estes resultados foram confirmados por McCLINTOCK et al. (1952), citado por ROBERTS et al. (1992) e ZOTTOLA et al. (1994), quando usaram culturas de microrganismos produtores de nisina no processamento do queijo Gruyère, com intuito de inibir os esporos anaeróbios.

De acordo com HENNING et al. (1986), a nisina foi aceita como aditivo em alimentos em 1969 pelo Comitê conjunto da Organização para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial da Saúde (WHO). Em 1988, o órgão "Food and Drug Administration" (FDA) considerou essa bacteriocina como uma substância status "GRAS" (Generally recognized as safe) ou seja, segura para a saúde do consumidor (BENKERROUM & SANDINE, 1988; HARRIS et al., 1991).

Segundo DELVES-BROUGHTON et al. (1996), o uso da nisina está aprovado em 50 países, sendo utilizado extensivamente no continente Europeu (RAYMAN et al., 1981; HENNING et al., 1986a), onde é aplicada em diferentes produtos como queijos, leites, bebidas, alimentos enlatados, sobremesas, carnes curadas, etc.

Um dos grandes problemas encontrados em queijos, está comumente associado a presença de esporos anaeróbios como os dos *Clostridium butyricum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium sporogenes* e ainda em alguns casos *Clostridium botulinum* (FOWLER, 1979). Estes esporos, quando presentes, são oriundos dos ingredientes utilizados na fabricação de queijos e podem ser ativados pelo processo térmico, causando problemas posteriores em condições anaeróbicas como estufamento tardio, produção de odor putrefativo e produção de toxinas (FOWLER, 1979; EAPEN et al., 1983; ROBERTS & ZOTTOLA, 1994).

A crescente demanda do mercado consumidor pelos produtos com menores teores de gordura e de sódio pode, como consequência, ocasionar uma modificação na composição de queijos, que ao serem estocados à temperatura ambiente, comprometem sua segurança (ROBERTS & ZOTTOLA, 1993). Dados da literatura (FOWLER, 1979; SOMERS & TAYLOR, 1987; BENKERROUM & SANDINE, 1988; ECKNER, 1992; ROBERTS & ZOTTOLA, 1993) mostram que a nisina tem sido utilizada com sucesso na fabricação de queijos, impedindo a germinação e/ou sobrevivência de microrganismos indesejáveis. Para reforçar essa idéia, ECKNER (1992), afirmou que a nisina, permite elevar a margem segurança em queijos, podendo com sua presença aumentar as opções de composição desse produto alimentício.

A concentração da nisina requerida para o processamento de queijo, depende de alguns fatores, como a biocarga de esporos presentes na matéria-prima, concentrações de

cloreto de sódio, fosfato de sódio, pH e atividade de água presentes (FOWLER, 1979; DELVES-BROUGHTON, 1990b).

De acordo com ECKNER (1992), níveis de 250 a 500 UI de nisina/g de queijo controlam a deterioração não botulínica em queijos pasteurizados, enquanto concentrações de 500 a 10000 UI/g de produto são necessárias para retardar ou prevenir a formação da toxina e o crescimento do *Clostridium botulinum*, vindo assim a confirmar o que foi descrito por SOMERS & TAYLOR (1987) apud DELVES-BROUGHTON (1990b). Dados mais precisos, sobre os níveis de nisina a serem utilizados no controle de microrganismos anaeróbios formadores de esporos em queijos, foram especificados pela Companhia Applin & Barrett Ltd., que recomenda adições de 100, 150 e 250 UI/g (suplementada por Nisaplin) para os produtos que contenham 10, 100 e 1000 esporos/g, respectivamente (FOWLER, 1979; ROBERTS & ZOTTOLA, 1993).

Em uma pesquisa desenvolvida por ROBERTS & ZOTTOLA (1993), foi verificado o efeito da nisina (301 e 387 UI/g) na vida de prateleira de queijos pastosos, contendo diferentes porcentagens de umidade e inóculos de 1000 esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679/g de queijo, sendo os mesmos fabricados a partir de queijo Cheddar, contendo nisina como ingrediente. Deste experimento, foi observado que os queijos pastosos, com 53% de umidade e que continham nisina, tiveram uma maior vida de prateleira do que aqueles desprovidos desta bacteriocina, nas temperaturas estudadas, 22 e 37°C. Foi notado, também, que quando queijos com 60% de umidade, contendo nisina, foram comparados com o controle (sem nisina), tiveram sua vida de prateleira mais longa do que este último, quando a temperatura de incubação foi 22°C. Entretanto, foi notado que a vida de prateleira não diferiu, entre queijos com o teor de 60% de umidade, contendo ou não nisina, quando a temperatura empregada foi de 37°C.

ZOTTOLA et al. (1994) com o objetivo de estudar a vida de prateleira de queijos pastosos, fabricaram queijos com 53% de umidade contendo 387 UI de nisina/g e queijos

com 60% de umidade adicionados de 301 UI de nisina/g. Durante a fabricação, todos os queijos foram inoculados com 2×10^3 esporos de *Clostridium sporogenes* PA 3679, e depois de processados foram armazenados à 22°C por um período de 6 meses e à 37°C por 90 dias. Os resultados demonstraram que os queijos com 60% de umidade e desprovidos de nisina deterioraram em 14 dias, quando armazenados a 22°C, enquanto que, os produtos que continham nisina tiveram uma vida de prateleira de 87 dias, nas mesmas condições. Os queijos com esse mesmo teor de umidade, armazenados a 37°C, sofreram deteriorações após o período de 10 dias, com a presença ou não de nisina. Em queijos com 53% de umidade foi constatado um aumento da vida de prateleira, em ambas as temperaturas estudadas. Neste caso, a deterioração dos queijos que não continham nisina, ocorreu em 67 dias e 24 dias quando armazenados à 22°C e 37°C, respectivamente. Os produtos adicionados de nisina, permaneceram em bom estado, após 6 meses de vida de prateleira à 22°C e por 90 dias quando a temperatura utilizada foi 37°C. Em um segundo experimento, ZOTTOLA et al. (1994), fabricaram queijos pastosos, a partir de uma mistura de queijos com ou sem nisina. Finalizado o processamento, os queijos pastosos possuíam 44 e 60% de umidade e 0, 100 e 300 UI de nisina por grama do produto. Durante a fabricação, os queijos foram inoculados com diferentes microrganismos. Todos os queijos que continham *Staphylococcus aureus* 196E e aqueles com *Clostridium sporogenes* PA 3679 foram armazenados à 23°C, somente, os inoculados com *Listeria monocytogenes* foram estocados à 4°C e 23°C, para verificar se a nisina presente nos queijos, atuava como agente antimicrobiano sobre essas bactérias. Foi observado que o número de colônias de *Listeria monocytogenes*, presentes nos queijos pastosos com 44% de umidade, apresentou uma diminuição mais acentuada de *Listeria monocytogenes*, na presença de nisina, quando a temperatura empregada foi de 23°C. Para os queijos com 60% de umidade, o declínio do número de colônias foi maior do que aquele encontrado nos queijos de baixo teor de umidade. Nestes queijos, *Listeria monocytogenes* não foi detectada depois de 56 dias de armazenamento à 23°C. A nisina também foi bastante eficiente na destruição de células de *Staphylococcus aureus*, não sendo detectado esse microrganismo depois de 5 dias de armazenamento à 23°C. No que diz respeito ao *Clostridium sporogenes*, foi notado que ocorreu germinação dos esporos e crescimento à

23°C em ambos os teores de umidade estudados, com exceção daqueles queijos que continham 60% de umidade e 300 UI de nisina/g do produto. Os pesquisadores sugeriram que a utilização de queijos contendo nisina, como ingrediente em queijos pastosos, poderia ser um método efetivo no controle de microrganismos indesejáveis.

A utilização da nisina no controle de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 também foi estudada, em queijo "Cottage" por BENKERROUM & SANDINE (1988) quando conduziram dois experimentos. O primeiro deles, envolveu duas séries de 3 amostras cada, contendo uma mistura estéril de 250g de queijo e 50 ml de creme pasteurizado (leite com 12% de gordura) cada uma. A primeira amostra de cada série foi destinada a adição de nisina e *Listeria monocytogenes*, perfazendo uma concentração final de $2,55 \times 10^3$ UI/g e $3,5 \times 10^5$ células/g de queijo, respectivamente. A outra amostra designada de controle positivo teve somente adição da bactéria estudada, enquanto que a terceira delas serviu como controle negativo. Destas amostras, uma das séries foi incubada a 4°C e a outra a 37°C. O segundo experimento realizado foi diferente do anterior pela não esterilização da mistura e pela temperatura de incubação, que só ocorreu a 4°C. Os dados obtidos revelaram que em ambos os casos, com ou sem esterilização, a presença de *Listeria monocytogenes* não foi detectada depois de 24 horas nas condições estudadas, permitindo aos autores concluir que a adição da nisina não somente inibiu o crescimento mas também eliminou esse microrganismo.

O efeito da adição da nisina em queijo "Cottage" (pH 4,6-4,7) inoculado com *Listeria monocytogenes* F6861 também foi estudado por FERREIRA & LUND (1996). Foi verificado que na presença de 2000 UI/g de queijo, a morte das células de *Listeria monocytogenes* foi rápida e o número de *Listeria* viáveis reduziu mais de 1000 vezes dentro de 7 dias, durante o armazenamento a 20°C. Depois deste período, o número de microrganismos patogênicos tornou-se abaixo do limite de detecção. Por outro lado, em um experimento paralelo, sem adição de nisina, o número de células viáveis da linhagem F6861 diminuiu aproximadamente 10 vezes à 20°C/7 dias. Deste modo, os autores concluíram o

trabalho afirmando que o uso mais apropriado da nisina, como inibidor de *Listeria monocytogenes*, é em alimentos com variação de pH entre 4,5-6,0.

DAVIES et al. (1997), para avaliarem a eficácia da nisina no controle de *Listeria monocytogenes* em queijos do tipo ricota, utilizaram dois métodos para a fabricação dos mesmos, que diferiram no pH, devido a adição de ácido acético a um deles. Em ambos tratamentos, os queijos foram preparados com leite não pasteurizado e aos diferentes lotes foram adicionadas concentrações de Nisaplin (1,25 e 2,5 mg/l de leite). Em etapa posterior, os queijos foram inoculados com um coquetel composto de 5 linhagens de *Listeria monocytogenes* por grama de queijo, na concentração de 10^2 - 10^3 UFC. Depois da adição do inóculo foi utilizado um "stomacher" para homogeneização. Quantidades de 15 gramas foram então distribuídas em recipientes estéreis e incubadas à temperatura de 6-8°C por um período de 70 dias. Durante esse período, as análises das amostras revelaram que a concentração de 2,5 mg/l utilizada no leite foi bastante efetiva que inibiu o crescimento de *Listeria monocytogenes* até 55 dias, quando o Método 1 foi utilizado (pH 6,1). Quando o Método 2 foi aplicado (pH 5,9), esse patógeno, não foi detectado até o último dia de vida-de-prateleira. Os queijos fabricados sem adição de nisina (controle) continham, depois de 15 dias, concentrações de *Listeria monocytogenes*, consideradas perigosas para a saúde. Análises dos níveis residuais de nisina em queijos demonstraram que a retenção dessa bacteriocina é grande, com perda apenas de 10-32% durante a incubação de 10 semanas à temperatura de 6-8°C.

MAISNIER-PATIN et al. (1992) realizaram um estudo onde foi empregada a cultura de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, produtora de nisina (Nis+) para avaliar o seu potencial de inibição frente a linhagem V7 de *Listeria monocytogenes*, durante a fabricação e maturação de queijos Camembert. Dentre as diferentes concentrações de *Listeria monocytogenes* (10^1 , 10^3 e 10^5 UFC/ml) adicionadas ao leite pasteurizado (72°C/15 segundos), os autores concluíram que a nisina produzida pela cultura lática foi mais efetiva quando o leite continha concentrações de 10^1 e 10^3 *Listeria monocytogenes*/ml. Isto porque,

no final do período de maturação (5 semanas), os queijos inoculados com 10^5 UFC/ml apresentaram uma redução de apenas 2,5 unidades logarítmicas, quando comparado ao controle enquanto que, nas outras concentrações testadas, os resultados foram menores que 10 UFC/g. Segundo os autores (MAISNIER-PATIN et al., 1992) a cultura de *Lactococcus lactis* (Nis+) é capaz de controlar *Listeria monocytogenes* durante a fabricação dos queijos e que, a nisina produzida por ela, poderia ser útil para prevenir uma possível pós-contaminação do leite.

RODRIGUEZ et al. (1998) também empregaram a cultura de *Lactococcus lactis* produtora de nisina, para investigar a atividade inibitória desse microrganismo na sobrevivência de *Listeria innocua* durante a maturação do queijo Manchego. O leite de ovelha cru, destinado ao processamento dos queijos Manchego, foi inoculado com aproximadamente 10^5 *Listeria innocua*/ml e com 1% da cultura láctica de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ESI 515. Após 60 dias de maturação, as contagens de *Listeria innocua* em queijos foram reduzidas de 4,62 unidades logarítmicas. Como a nisina produzida pelo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ESI 515 permaneceu ativa durante todo o período de maturação, os autores concluíram que o emprego dessa cultura poderia ser útil, para a fabricação de queijos utilizando leite cru ou no controle de *Listeria* spp., que poderia ocorrer no leite como contaminação pós-processo.

O emprego da nisina também pode ser aplicado ao leite integral pasteurizado, principalmente em países onde o clima é quente e o transporte e refrigeração inadequados (EAPEN et al., 1983 e DELVES-BROUGHTON, 1990b). De acordo com ANONYMOUS (1989) apud DELVES-BROUGHTON (1990b), a nisina tem-se apresentado eficiente na conservação deste produto, onde níveis de 30 a 50 UI/ml, têm praticamente dobrado sua vida de prateleira, a diferentes temperaturas. Relatos descritos por FOWLER (1979), indicaram que concentrações de 10mg/l de Nisaplin neste mesmo alimento, proporcionaram um aumento da vida de prateleira de 2 a 6 dias.

A eficácia da nisina em leites fluidos também foi comprovada por JUNG et al. (1992), que avaliaram a influencia da gordura e de emulsificante (Tween 80) na eficiência da nisina em inibir *Listeria monocytogenes* Scott A e *Listeria monocytogenes* Jalisco. No experimento foram preparados leites com diferentes concentrações de gordura (0 e 12,9%) e de nisina (0 e 50 UI/ml), com inóculos de aproximadamente \log_{10} 7 a 7,5 UFC/ml. Desse modo, foi possível verificar que a *Listeria monocytogenes* Scott A depois de duas horas de incubação a 37°C em leite magro, contendo 10 e 50 UI de nisina/ml teve sua carga microbiana reduzida a \log_{10} 2,90 UFC/ml e \log_{10} 0,30 UFC/ml, respectivamente. No entanto, para leites denominados "half-and-half" (12,9% de gordura), as respostas obtidas pelo uso dessa bacteriocina, diferiram muito do caso anterior, quando 10 UI de nisina/ml foram aplicadas, a população alcançou \log_{10} 6,57/ml. Quando foram empregadas 50 UI de nisina/ml, a flora estudada atingiu \log_{10} 5,87 UFC/ml. No que se refere ao experimento conduzido com *Listeria monocytogenes* Jalisco, pode-se afirmar que os dados obtidos foram praticamente similares aos encontrados para *Listeria monocytogenes* Scott A. Quanto ao efeito dos emulsificantes, foi constatado que o Tween 80, aumentou significativamente a atividade da nisina sobre *Listeria monocytogenes* em leite independente da concentração de gordura existente.

O efeito da adição da nisina em leite também foi pesquisado por MAISNIER-PATIN et al. (1995), que estudaram a cinética de destruição térmica de duas linhagens de *Listeria monocytogenes* (V7 e Scott A) em leite desnatado adicionados de 25 e 50 UI de nisina/ml aquecido a 60°C. Os autores verificaram que a presença de nisina reduziu sensivelmente ou eliminou a fase "lag", aumentando a velocidade de morte destes microrganismos. Empregando as mesmas concentrações de nisina em leite, com temperaturas variando entre 54 e 65°C, os pesquisadores verificaram que ocorreu uma redução da resistência térmica de *Listeria monocytogenes* V7. MAISNIER-PATIN et al. (1995) sugeriram que o efeito combinado temperatura e nisina pode aumentar consideravelmente a margem de segurança em queijos, fabricados com leite cru, em relação aos microrganismos patogênicos.

WIRJANTORO & LEWIS (1996), com o intuito de verificar o efeito da nisina sobre a qualidade e vida-de-prateleira de leite integral, realizaram um experimento, onde foram adicionadas às amostras de leite, antes do processo de pasteurização, concentrações de nisina que variaram de zero a 50 UI/ml. Depois do processamento térmico, as amostras foram armazenadas a 10°C. Em diferentes intervalos, durante a vida-de-prateleira, foram determinadas as contagens totais de microrganismos (PCA) e contagens de *Lactobacillus*, pH e acidez titulável. Os resultados revelaram que, todas as concentrações de nisina utilizadas, foram efetivas no controle do crescimento de microrganismos em leite. Leites contendo concentrações de 40 e 50 UI de nisina/ml não deterioraram durante 41 dias enquanto que no controle, esse tempo foi apenas 14 dias. Desta forma, os pesquisadores concluíram que a adição de nisina ao leite antes da pasteurização, aumenta sua vida-de-prateleira, quando armazenados a 10°C.

Com objetivo de estudar o efeito combinado da nisina e do sistema lactoperoxidase (SLP) sobre *Listeria monocytogenes*, ZAPICO et al. (1998), adicionaram ao leite desnatado UHT, 10 ou 100 UI de nisina por ml. Foi constatado que essas concentrações de nisina não tiveram praticamente nenhum efeito sobre a contagem inicial de *Listeria monocytogenes* (10^4 UI/ml) depois de 24 horas, quando o leite desnatado foi armazenado a 30°C. No entanto, quando o sistema lactoperoxidase foi adicionado a esse mesmo substrato, foi obtida uma redução decimal de 3 ciclos logarítmicos no número de *Listeria monocytogenes*. Os dados obtidos, também revelaram que a nisina quando adicionada ao leite desnatado, juntamente com o sistema lactoperoxidase, depois de 3 horas de crescimento do patógeno, promove uma redução bem maior (5,7 ciclos logarítmicos) no número de *Listeria monocytogenes* presente. A redução foi ainda mais acentuada (7,4 ciclos logarítmicos) quando o SLP e a nisina foram adicionados ao substrato depois de 5 horas de crescimento microbiano. Os resultados mostraram que o efeito combinado do SLP e da nisina pode ser utilizado no controle de patógenos em produtos de laticínios.

O efeito do sistema lactoperoxidase (SLP) e da nisina, sozinha ou em combinação, sobre *Listeria monocytogenes* CIP 82110 em leite desnatado, também foi determinado por BOUSSOUEL et al. (1999) quando aplicaram a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), para análise das interações entre nisina (0-200UI/ml), pH (5,4-6,6), tempo de incubação (0-36h ou 0-144h) e o sistema lactoperoxidase, em leite desnatado, armazenado a 25°C. A ação do SLP, como também da nisina, foi dependente do tempo de incubação. O efeito da nisina também foi dependente do pH utilizado na amostra, sendo mais efetiva a valores baixos de pH. A combinação entre SLP e a nisina foi efetiva no controle de *Listeria monocytogenes*; depois de 144 horas, apenas 10 UFC/ml foram detectadas. Desta forma, esses pesquisadores confirmaram o que foi descrito por ZAPICO et al. (1998), quando relataram o aumento do efeito bactericida, pela utilização conjunta do SLP e da nisina.

Em produtos enlatados, a adição da nisina tem apresentado uma série de vantagens em experimentos realizados com sopas, vegetais, leites, pudins e carnes. De acordo com EYLES & RICHARDSON (1988) apud DELVES-BROUGHTON (1990b), o uso do tratamento térmico dispensado aos enlatados, muitas vezes não consegue eliminar os esporos resistentes de microrganismos termófilos como *Bacillus stearothermophilus* e *Clostridium thermosacharolyticum*, ocorrendo posteriormente a degradação dos produtos, principalmente quando os mesmos são submetidos ao armazenamento sob condições térmicas impróprias. Portanto, a utilização da nisina fornece uma maior margem de segurança ao impedir a deterioração termofílica.

O uso da nisina também pode ser empregado para controlar as deteriorações em alimentos ácidos causadas por *Bacillus termoacidurans*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc pleofructi*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Clostridium pasteurianum* e outros (EAPEN et al., 1983 e DELVES-BROUGHTON, 1990b).

Em outros produtos enlatados como pudins, a presença de cereais tais como semolina, tapioca e outros ingredientes que gelatinizam, durante o aquecimento, reduzem a eficiência

de transferência de calor, fazendo com que o processo térmico aplicado a estes produtos seja prolongado, resultando em perdas nas propriedades organolépticas. Nestes casos, a utilização da nisina resulta na redução do tratamento térmico necessário para a esterilização desses produtos (EAPEN et al., 1983). No que se refere às concentrações de nisina, que devem ser aplicadas aos produtos enlatados, níveis diferentes da mesma são indicados na literatura para cada tipo de enlatado. Porém, segundo DELVES-BROUGHTON (1990b), 100 a 200 UI de nisina/g são geralmente usados.

Em carnes, o uso da nisina tem sido cada vez mais pesquisado, com o intuito de eliminar ou reduzir o uso de nitritos nestes alimentos, fornecendo deste modo um produto mais saudável ao consumidor. De acordo com ABEE et al. (1995), a principal preocupação com o uso de nitrito em carnes curadas é a possibilidade de formação de N-nitrosaminas são substâncias pré-cancerígenas.

TAYLOR & SOMERS (1985) ao estudarem a eficácia do uso de nisina em bacon, chegaram a conclusão que esta bacteriocina em combinação com nitrito, é bastante efetiva contra *Clostridium botulinum* neste produto.

Estudos realizados em peixes armazenados com 100% de dióxido de carbono, verificaram que a nisina retarda a produção de toxina de *Clostridium botulinum* nestes alimentos. Sendo assim, quando temperaturas de 10°C foram empregadas, a produção da toxina foi retardada em 5 dias, quando comparada ao controle (TAYLOR et al., 1990).

Em um trabalho mais recentemente publicado por MAHADEO & TATINI (1994) foi observado que a nisina quando aplicada a água de escaldado em perus resultou na redução do número de *Listeria monocytogenes* presente.

Entretanto, apesar das inúmeras pesquisas realizadas na literatura, estudos complementares devem ser realizados em produtos cárneos, em decorrência de problemas

relacionados com a não distribuição homogênea no alimento e a possível interação da nisina com as partículas do produto (TAYLOR & SOMERS, 1985; DELVES-BROUGHTON, 1990b).

A nisina também tem sido empregada com sucesso em bebidas achocolatadas e em bebidas alcoólicas. HEINEMANN et al. (1965) ao utilizarem 80mg de nisina/L no preparo de bebidas achocolatadas estéreis, observaram que mesmo com armazenamento a temperaturas de 35°C, o produto não sofreu deterioração. Posteriormente, SHEBATA et al. (1976) apud HURST (1983) verificaram que a utilização da nisina em leites achocolatados permitiu a redução em 80% do processo de aquecimento, podendo o mesmo ser estocado por 21 dias a 37°C sem indícios de deterioração. Em bebidas alcoólicas, a nisina é utilizada na preservação ou controle da contaminação por bactérias Gram-positivas indesejáveis no produto como por exemplo, os *Lactobacillus* (DELVES-BROUGHTON, 1990b). Em experimentos conduzidos em planta piloto por RADLER (1990), foi observado que a nisina eliminou as bactérias ácido-lácticas presentes sem, que a fermentação do vinho, por leveduras, fosse afetada.

No intuito de conhecer e levantar informações, sobre a resistência térmica de *Listeria monocytogenes* Scott A e tratamentos combinados de calor-nisina, foi elaborada uma tabela com os dados obtidos da literatura (ver Apêndice 1).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes e meio de cultura

Os reagentes utilizados no experimento foram de pureza analítica (P.A.) e os meios de cultura utilizados foram aqueles propostos pelos métodos oficiais de análises microbiológicas.

3.1.2. Amostras

Para avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em queijos Minas frescal, 20 amostras, em suas próprias embalagens, foram adquiridas de diversos pontos comerciais na cidade de Campinas (SP), sendo 10 delas provenientes de feira-livre e dez de supermercado. Após a coleta, estes alimentos foram transportados para o laboratório em recipientes com gelo, onde foram mantidos sob refrigeração até o momento de serem analisados, em um prazo não superior a uma hora.

3.1.3. Microrganismos

Para o processamento de queijos foi utilizada a cultura de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (NCDO 2001) que foi fornecida pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Na avaliação da metodologia para enumeração, determinação da curva de crescimento em meio não seletivo e da definição do efeito inibitório conjugado calor-nisina em leite

integral estéril e em queijos Minas frescal foi utilizada a cultura padrão de *Listeria monocytogenes* Scott A, gentilmente doada pelo Laboratório de Higiene do Departamento de Tecnologia de Alimentos (UNICAMP).

3.1.4. Nisina

A nisina utilizada para verificação do seu efeito inibitório foi fornecida sob forma de pó, contendo 10^6 UI/g, pela Applin Barrett Ltda.

3.1.5. Utensílios.

Para a desinfecção de utensílios, empregados na fabricação dos queijos Minas frescal, foi utilizado o detergente alcalino clorado Quimistrol Su 359.

3.2. Métodos

3.2.1. Avaliação da contaminação dos queijos Minas frescal comercializados.

3.2.1.1. Amostragem.

Amostras de 25 gramas, retiradas de diferentes partes de cada queijo, foram homogeneizadas em liquidificador estéril com 225 ml de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB#1-Oxoid). Os passos subsequentes seguiram como referido no item 3.2.1.2.

3.2.1.2. Metodologia para detecção, isolamento e identificação de *Listeria* spp. em queijos.

Para detecção, isolamento e identificação da *Listeria monocytogenes* em queijos Minas frescal foi utilizada a metodologia descrita por WARBURTON et al. (1992) (Figura 4), devido a sua efetividade na recuperação de células injuriadas como também, daquelas que se encontram em baixo número nos alimentos.

As amostras de queijos Minas frescal após serem homogeneizadas, foram incubadas a 30°C por 24 e 48 horas. Depois de cada um desses tempos, foi realizado o esgotamento em superfície de placas contendo três meios diferentes: meio Oxford agar (OXA-Oxoid) adicionado de seu suplemento (*Listeria* Selective Supplement-Oxoid), meio ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM-Difco) suplementado com moxalactam (20mg/litro-Difco), esculina (1g/litro-Merck) e citrato férrico amoniacal (0,5g/litro - BDH) e em meio Oxford modificado (MOX-Oxoid) suplementado com moxalactam (20mg/litro-Difco) e colistina metassulfonato (10mg/litro-Sigma). Placas contendo LPM foram incubadas a 30°C por 24 a 48 horas e as com meios OXA e MOX a 35°C por este mesmo período. Simultaneamente, porções de 0,1 ml do LEB#1, anteriormente citado, (incubados por 24 e 48 horas) foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 ml de caldo Fraser modificado (MFB-Oxoid), homogeneizados e incubados a 35°C por 24 e 48 horas para o

enriquecimento secundário. Após incubação, uma alçada proveniente de cada um dos tubos de cor escura, foi plaqueada nos três meios utilizando-se o mesmo procedimento descrito.

Para identificação, três colônias típicas (cor negra com halo preto, apresentando na região central uma concavidade) foram retiradas de cada uma das placas, para serem purificadas em ágar soja tripticase (TSA - Oxoid) suplementado com 0,6% de extrato de levedura (YE-Oxoid) e incubadas a 30°C por 24 a 48 horas. A seguir, as colônias foram examinadas sob luz transmitida (iluminação de Henry) a 45°. Colônias típicas de *Listeria monocytogenes*, foram então submetidas a uma série de testes para confirmação. Desta forma, foram realizados: Gram, motilidade em ágar semi-sólido (SIM), catalase, oxidase, redução do nitrato, vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), motilidade ao microscópio e as análises bioquímicas do sistema API-LISTERIA (10 testes-Biomériex) (BILLE et al., 1992; DEVER et al., 1993). As colônias não caracterizadas como pertencentes ao gênero *Listeria* foram identificadas através da metodologia descrita pelo Manual de Bergey (SNEATH, 1986).

3.2.1.3. Metodologia para enumeração de *Listeria* spp. em queijos.

Para enumeração dos microrganismos presentes nas amostras, 11g de queijo foram diluídas (1:10) com água peptonada 0,1% estéril, com ajuda de um liquidificador estéril em condições assépticas por 2 minutos. A seguir, após diluições seriadas, 0,1 ml destas foram inoculadas em placas contendo o meio seletivo Oxford modificado (MOX) e incubadas a 35°C por 48 horas (ABDALLA et al., 1993). Decorrido este tempo, as colônias típicas foram contadas e até 5 colônias por placa foram selecionadas para confirmação (3.2.1.2.). A metodologia de enumeração foi realizada paralelamente ao procedimento para detecção, isolamento e identificação (3.2.1.2.).

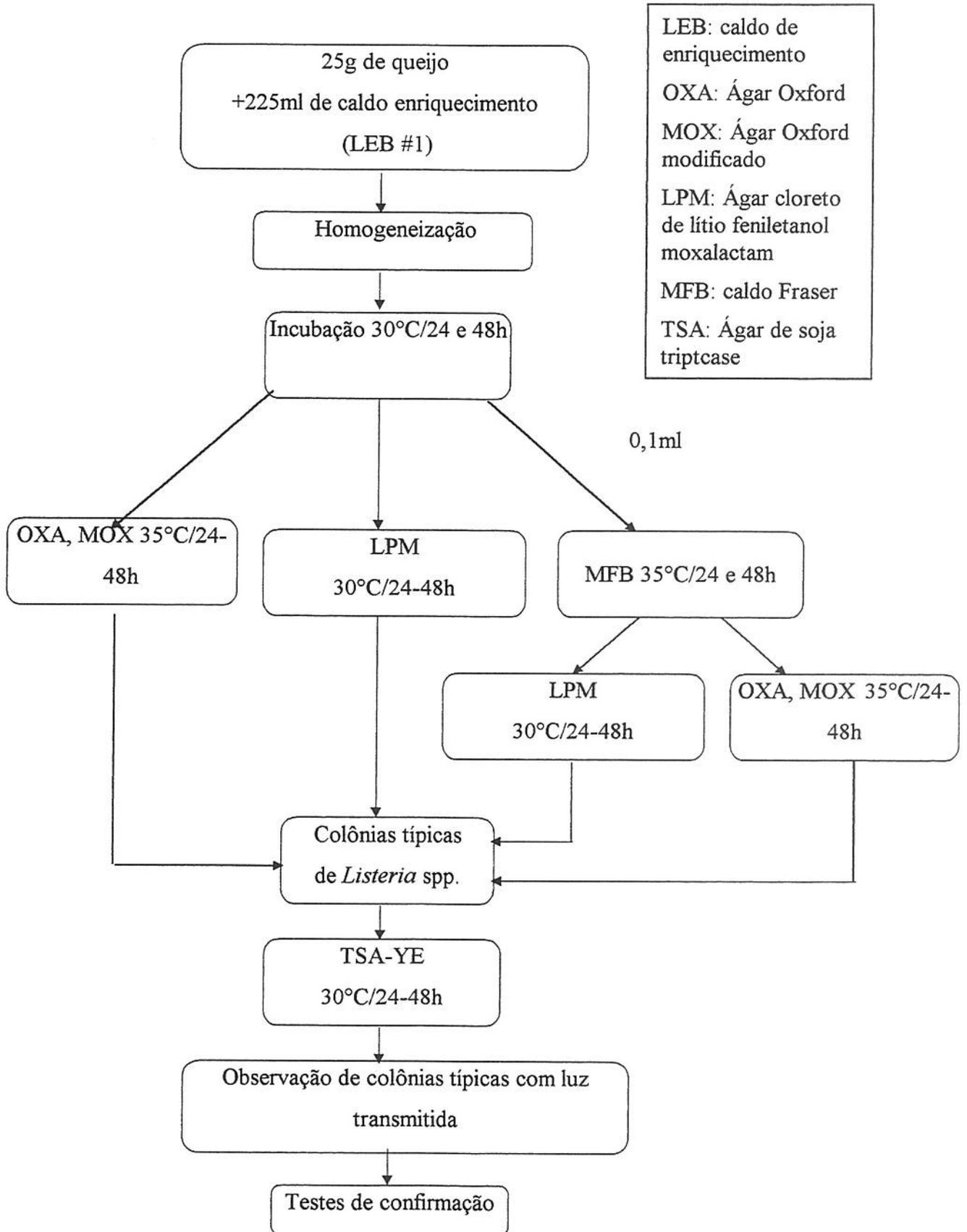


Figura 4: Fluxograma da metodologia de detecção, isolamento e identificação de *Listeria* spp

3.2.2. Avaliação de meios de cultura para enumeração de *Listeria monocytogenes* Scott A não injuriada e termicamente injuriada.

Foram avaliados 3 meios de cultura TSA-YE, MOX e TSAP-YE, com o objetivo de determinar o meio que melhor recuperasse as células de *Listeria monocytogenes* Scott A termicamente injuriada e não injuriada.

3.2.2.1. Preparo dos inóculos.

Para a obtenção da cultura de *Listeria monocytogenes* Scott A injuriada e não injuriada este microrganismo foi inoculado em um tubo contendo 30 ml de caldo de soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE) e cultivado a 35°C por 20 horas. Decorrido este tempo, a cultura foi centrifugada a 8000xg por 12 minutos à 4°C, para a recuperação das células. Após descarte do sobrenadante, as células do precipitado sofreram duas lavagens consecutivas, com tampão fosfato salino pH 7,2 estéril. A massa celular assim obtida foi ressuspensa na mesma solução salina tamponada para, logo após, ser ajustada ao padrão McFarland # 1 (3×10^8 células/ml). O passo subsequente foi a realização de diluições seriadas nesse mesmo tampão, até atingir as concentrações desejadas (10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^7 células/ml).

Tubos de ensaios contendo 9 ml de leite desnatado estéril (autoclavado à 121°C por 10 minutos) reconstituído a 11%, foram inoculadas com 1 ml das concentrações acima descritas, de modo a obter duas séries de tubos, com concentrações finais de 10^1 , 10^2 , 10^3 e 10^6 células/ml. A primeira série de tubos contendo diferentes concentrações da bactéria patogênica não sofreu nenhum tipo de tratamento enquanto, a segunda série, contendo as mesmas concentrações de inóculo, foi submetida ao tratamento térmico por 20 minutos à 56°C, em banho-maria (YU & FUNG, 1992) e imediatamente resfriadas.

3.2.2.2. Enumeração de *Listeria monocytogenes* Scott A.

Foram testados 3 meios de cultura, sendo um deles o meio Oxford modificado (MOX), o meio ágar de soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) e o meio TSA-YE suplementado com 1% de piruvato de sódio. Para tanto, foram realizadas diluições seriadas das amostras de leite inoculadas, de acordo com o nível do inóculo, em tampão fosfato salino estéril pH 7,2 estéril. Volumes de 0,1 ml foram distribuídos em placas de Petri, em duplicata, contendo o meio MOX (ABDALLA et al., 1993) como meio de cultura, incubadas a 35°C por 5 dias para a enumeração das colônias presentes. Paralelamente a este procedimento, as diluições acima referidas foram também plaqueadas em TSA-YE (MAISNIER-PATIN et al., 1995) e em meio TSAP-YE sendo que, para comparação, os meios foram incubados a 30°C por 5 dias.

3.2.3. Determinação da curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* Scott A em meio não seletivo.

Com o intuito de estabelecer o tempo necessário para que as células de *Listeria monocytogenes* Scott A alcançassem o final da fase logarítmica (10^9 células/ml), foi realizado um experimento para determinar a curva de crescimento desse microrganismo em meio não seletivo.

3.2.3.1. Preparo do inóculo.

Para o preparo do inóculo, a cultura pura de *Listeria monocytogenes* Scott A foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 30 ml de caldo de soja tripticase adicionado de 0,6% (p/v) de extrato de levedura (TSB-YE) e incubado a 35°C por um período de 24 horas. A seguir, a cultura foi centrifugada a 8000xg por 12 minutos à 4 °C, para recuperar a massa celular. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi submetido a duas lavagens consecutivas com tampão fosfato salino pH 7,2 estéril. A massa celular assim

obtida foi ressuspensa nesta mesma solução tamponada, para logo a seguir, ser ajustada ao padrão McFarland # 1 obtendo desse modo, uma concentração de 3×10^8 células por ml. A seguir, um volume de 1 ml desta solução foi diluído em 9 ml de solução tamponada, onde logo após homogeneização, foi retirada uma alíquota de 1,5 ml para imediatamente ser adicionada a um erlenmeyer de 250 ml contendo 148,5ml de TSB-YE.

3.2.3.2. Curva de crescimento.

O meio de cultura inoculado, referido no item 3.2.3.1. foi homogeneizado e dele foram retiradas duas alíquotas de 1 ml, para determinar o número inicial de microrganismos/ml presente. Imediatamente após a amostragem, o erlenmeyer foi submetido a incubação a temperatura de 35°C, em banho-maria, por trinta minutos. Decorrido este tempo, procedeu-se uma nova amostragem com a retirada de mais duas amostras de 1 ml. Este procedimento foi repetido a cada meia hora, até completar 15 horas de experimento. Na sequencia, as amostras foram diluídas em solução salina estéril e destas diluições 0,1 ml foram inoculadas em placas de Petri contendo como meio de cultura TSA-YE, definido como o melhor meio (item 3.2.2.), para o crescimento do microrganismo em estudo. As placas foram incubadas à 30°C por 48 horas e o número de colônias de microrganismos por ml foi determinado.

Com dos dados obtidos foi traçada uma curva de crescimento, onde o eixo da ordenada correspondeu aos logaritmos (log) dos números de microrganismos presentes no meio de cultivo e a abscissa ao tempo de retirada das amostras. O tempo de geração (g) foi calculado com dados encontrados durante a fase exponencial, de acordo com que foi descrito por MADIGAN et al. (1997).

3.2.4. Determinação da resistência ao calor e ao tratamento conjugado calor-nisina em leite integral estéril.

3.2.4.1. Técnica de preparo do inóculo.

Listeria monocytogenes Scott A foi inoculada em 30 ml de caldo de soja tripticase (TSB-Oxoid) suplementado com 0,6% (p/v) de extrato de levedura (YE-Oxoid) e incubado a 35°C por 24 horas. Decorrido este tempo, a cultura foi centrifugada a 8000 x g por 12 minutos a 4°C, para recuperação das células. Após o descarte do sobrenadante, as células do precipitado sofreram duas lavagens consecutivas com tampão fosfato salino pH 7,2 estéril, seguidos de recentrifugação. Essa massa celular foi ressuspensa em 10 ml da mesma solução salina tamponada. Logo a seguir, a densidade da suspensão bacteriana obtida foi ajustada ao padrão McFarland (#1), com intuito de atingir a concentração final de $3,00 \times 10^8$ UFC/ml. Um ml desta suspensão foi diluído em 9 ml do tampão fosfato salino. Desta solução, 1,5 ml foram transferidos para um erlenmeyer contendo 148,5 ml de TSB-YE e incubado em banho-maria a 35°C por nove horas, tendo como objetivo, permitir que as células alcançassem o final da fase logarítmica (10^9 células/ml). Decorrido este tempo, 100ml desta cultura foram transferidos para um erlenmeyer, com capacidade de 125 ml, vazio estéril e submetido a um choque térmico à 48°C em banho-maria, por um período de 10 minutos, cujo propósito foi aumentar a resistência térmica das bactérias cultivadas (LINTON et al., 1990). Decorrido esse tempo, a solução foi retirada do aquecimento e imediatamente resfriada em banho de gelo por 5 minutos.

3.2.4.2. Resistência térmica.

Da suspensão, resfriada, volumes de 1ml de inóculo foram transferidos para tubos de ensaio estéreis, contendo leite integral estéril (121°C/15 minutos), armazenados em banho de

gelo dentro de geladeira a 4°C (MAISNIER-PATIN et al., 1995). Em uma etapa subsequente, imediatamente antes do preenchimento dos tubos capilares (# W-100 µl-Wiretrol), os tubos de ensaio foram adicionados de determinadas concentrações de nisina conforme o plano experimental utilizado (Tabela 1) de modo que, os capilares contivessem em seu volume final, uma concentração que variasse de 0 a 50 UI/ml, de acordo com cada experimento (Tabela 1). Após homogeneização, os tubos capilares foram preenchidos, por capilaridade, com 100 µl de leite contendo inóculo e nisina. Ambas as extremidades dos capilares foram seladas com Critoseal (Oxford) e descontaminados por imersão em solução de 500ppm de hipoclorito por 5 minutos (MAISNIER-PATIN et al., 1995). No tratamento térmico foram utilizados diferentes temperaturas (Tabela 2). Para cada temperatura estudada, foram utilizados 12 tubos capilares. Esses tubos em duplicata foram colocados em um cesto metálico e submersos em banho-maria, onde permaneceram no aquecimento por 6 diferentes tempos programados. Decorrido estes tempos, os tubos foram removidos da água aquecida e rapidamente resfriados, em banho de gelo. Logo a seguir, após a descontaminação dos mesmos em hipoclorito, como citado acima, alíquotas de 0,1ml foram inoculadas em placas contendo o meio de cultura TSA-YE (pré-estabelecido no item 3.2.2.) e o número de unidades formadoras de colônias foi determinado.

3.2.4.3. Análise estatística.

Foi aplicado um plano experimental de Superfície de Resposta do tipo central composto ortogonal, que considerou as variáveis, concentração de nisina (UI/ml) e temperatura (T°C), conforme demonstrado na Tabela 1. Para cada ponto experimental foi levantada uma curva de sobreviventes em função do tempo de tratamento a temperatura programada. Este plano foi aplicado visando otimizar o tratamento termoquímico de forma a obter a combinação calor/nisina, que reduzisse mais efetivamente o número de *Listeria* presente (CARVALHO, 1998).

As temperaturas selecionadas (52°C - 68°C) para este experimento foram aquelas que se encontram dentro da faixa aplicada para o processo de pasteurização do leite e, também, inferiores a essas para verificar o efeito da nisina sobre *Listeria monocytogenes* nas determinadas temperaturas.

As concentrações de nisina empregadas, para tratamentos coadjuvantes com temperatura, foram de zero a 50 UI/ml.

Após seleção da faixa de temperatura a ser testada (52°C - 68°C), em tempos pré-determinados, e escolha da concentração máxima de nisina (50 UI/ml), foi delineado o plano experimental composto de 16 tratamentos (Tabela 1)

Tabela 1. Plano experimental fracional tipo central composto ortogonal

Tratamentos	Concentração de nisina(UI/ml)	Temperatura(°C)
01	25	68,00
02	7,3	66,00
03	42,7	66,00
04	25	52,00
05	25	60,00
06	50	60,00
07	25	60,00
08	25	60,00
09	42,7	55,00
10	25	60,00
11	0	60,00
12	25	60,00
13	25	60,00
14	25	60,00
15	25	60,00
16	7,3	55,00

Referência: CARVALHO (1998).

3.2.5. Validação do tratamento termoquímico em leite, para fabricação de queijos Minas frescal.

Para validar o modelo matemático foi selecionado um tratamento (64,4°C/2,3 segundos), entre as respostas estimadas de valores D reduzidos (Tabela 11) para *Listeria monocytogenes* Scott A.

3.2.5.1. Caracterização físico-química do leite cru e de queijos

As análises abaixo relacionadas foram realizadas em duplicata, nos três lotes de leite cru, destinados aos quatro diferentes processos de fabricação dos queijos Minas frescal e realizados neste trabalho.

3.2.5.1.1. Determinação da acidez titulável.

A determinação de acidez em leite foi realizada através da titulação de 10 ml de leite com hidróxido de sódio N/9 (soda Dornic), até o ponto de viragem com o indicador de fenofaleína. Os resultados foram expressos em graus Dornic (°D), de acordo com a metodologia descrita pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 1981). Para determinação de acidez em queijos foram pesados 10 gramas de amostra e a gordura foi determinada de acordo com a técnica preconizada pela AOAC (1995).

3.2.5.1.2. Determinação do pH.

Os valores de pH foram determinados através de utilização de um potenciômetro (Tecnal-modelo Digimed) devidamente calibrado antes de sua utilização.

3.2.5.1.3. Determinação da densidade.

Para esta determinação um lactodensímetro foi introduzido em uma proveta contendo 1000ml de leite. Para calcular a densidade foram considerados o valor lido no lactodensímetro e a temperatura da amostra analisada (BRASIL, 1981).

3.2.5.1.4. Determinação do teor de gordura.

O teor de gordura do leite e dos queijos foram determinados através do método de Gerber, como indicado pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 1981).

3.2.5.2. Caracterização microbiológica do leite cru e dos queijos

3.2.5.2.1. Detecção e enumeração de *Listeria* spp.

Para detecção de *Listeria* spp. foi utilizada a metodologia descrita por WARBURTON et al. (1992) e para enumeração a proposta por ABDALLA et al. (1993).

3.2.5.2.2. Detecção de *Salmonella* e enumeração de *Staphylococcus aureus*.

Para estas análises foram utilizadas metodologias recomendadas pela American Public Health Association (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992).

3.2.5.2.3. Detecção e quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli*.

Para determinar a presença desses microrganismos foram utilizados os kits SimPlate (Idexx-Laboratories, Inc.). As contagens positivas foram relacionadas com os valores apresentados em tabela dos números mais prováveis (NMP) - Idexx-Laboratories, Inc.

3.2.5.3. Preparo do inóculo de *Listeria monocytogenes* Scott A.

O inóculo de *Listeria monocytogenes* foi preparado para cada um dos processamentos de queijos Minas frescal, cujo objetivo foi obter uma concentração de células no leite de 10^5 UFC/ml.

Para o preparo do inóculo foi utilizada a metodologia descrita no item 3.2.3.1., tendo apenas como modificação, a substituição do TSB-YE do erlenmeyer por leite integral estéril ($121^\circ\text{C}/15$ minutos). A cultura foi incubada a 35°C e mantida em banho-maria por 11 horas até alcançar aproximadamente 3×10^8 microrganismos/ml. Decorrido este tempo, 100 ml desta cultura foram transferidos para um erlenmeyer de 125 ml estéril e submetido a um choque térmico a temperatura de 48°C , em banho-maria, por 10 minutos (LINTON et al., 1990). A seguir, 15 ml desta cultura foram retirados, em condições assépticas, e transferidos para um frasco de capacidade de 2 litros contendo 1485 ml de leite integral estéril. O volume do frasco foi homogeneizado para logo após, ser adicionado ao volume total de leite destinado ao processamento.

3.2.5.4. Preparo dos queijos.

Nesta etapa experimental, foram fabricados 4 queijos do tipo Minas frescal em cada um dos 4 processamentos realizados, totalizando 16 queijos fabricados.

No primeiro processamento, o leite foi inoculado com 10^5 UFC/ml de *Listeria monocytogenes* Scott A. No segundo, os queijos foram processados com o leite contendo a mesma concentração de *Listeria monocytogenes* anteriormente mencionada e 26,4 UI/ml de nisina (concentração pré-estabelecida no item 3.2.4.3.). No terceiro, ao leite utilizado para a fabricação dos queijos foi adicionado a mesma concentração de nisina previamente citada,

sem adição da bactéria patogênica. Por último, como controle foram preparados quatro queijos sem adição de *Listeria monocytogenes* Scott A e de nisina (Tabela 2).

Tabela 2. Diferentes tratamentos aplicados ao leite cru destinado a fabricação dos queijos Minas frescal

Processamentos	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A (10⁵ UFC/ml)	Nisina (26,4 UI/ml)	Tratamento térmico (T°C/segundos)
Primeiro	Inoculado	Sem adição	64,4 /2,3
Segundo	Inoculado	Adição	64,4 /2,3
Terceiro	Não inoculado	Adição	64,4 /2,3
Quarto	Não inoculado	Sem adição	64,4 /2,3

Para cada um dos quatro processamentos realizados, foi utilizado um volume de aproximadamente 15 litros de leite integral, que após a adição ou não de cultura pura de *Listeria monocytogenes* Scott A (10⁵ UFC/ml) e/ou de nisina (26,4 UI/ml), conforme descrito na Tabela 2, foi submetido a um tratamento térmico à 64,4°C por 2,3 segundos conforme condição previamente estabelecida (3.2.4.3). Esse tratamento térmico foi realizado em recipiente de alumínio, contendo termopar para controle da temperatura do leite. Em seguida, o leite foi resfriado à 35°C e mantido nesta temperatura durante o processo, através de banho-maria. Ao leite foi adicionado 1% (v/v) da cultura lática mesófila de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2001 e agitado para homogeneização. A seguir, foi adicionado a solução de cloreto de cálcio e por último, o coalho em pó comercial pré-reidratado, na quantidade necessária para promover a coagulação em 40 minutos. Em etapa posterior, a massa foi subdividida em cubos com arestas de aproximadamente 1,0 a 1,5 cm (com ajuda de liras estéreis), agitados (cuidadosamente) por um período de 25 minutos consecutivos, sendo os 10 primeiros agitados mais lentamente. Findo este tempo, o soro resultante foi drenado e o queijo passou para o processo de enformagem, em recipientes plásticos estéreis

com capacidade de meio quilo cada um. Decorridos 15 minutos, os queijos foram virados dentro das formas, nas quais permaneceram em repouso por 30 minutos, para logo a seguir, serem virados novamente, permanecendo em repouso por mais duas horas. Findo esse tempo, procedeu-se a salga e armazenamento em BOD à 7°C durante 24 horas. O passo subsequente, foi novamente a viragem do queijo e a salga seca das outras superfícies. Todos os queijos Minas frescal fabricados foram armazenados sob refrigeração em câmara BOD à 7°C.

3.2.5.5. Avaliação do tratamento empregado no processamento dos queijos Minas frescal.

A eficiência do tratamento térmico selecionado (64,4°C/2,3 segundos), empregado ao leite destinado à fabricação de queijos Minas frescal, foi avaliada através de análise dos queijos no primeiro, no sétimo, no décimo quarto e no vigésimo-primeiro dias de vida de prateleira. Para essa avaliação foi utilizada a metodologia de enumeração de *Listeria* descrita no item 3.2.1.3. e testes de confirmação como mencionado no item 3.2.1.2. Paralelamente a estes procedimentos, amostras destes mesmos queijos, foram retiradas para verificação da presença de *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*, fazendo uso da metodologia preconizada pela American Public Health Association (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992). Nestas amostras, foi também determinada a presença de coliformes totais e *Escherichia coli* (NMP), empregando-se o kit SimPlate. Na retirada das amostras, durante a vida de prateleira, as variáveis acidez titulável (% de ácido láctico) (3.2.5.1.1.), pH (3.2.5.1.2.) e porcentagem de gordura (3.2.5.1.4.) foram determinadas.

3.2.5.6. Sanificação dos utensílios

Os utensílios empregados neste experimento, resistentes ao calor, foram submetidos a esterilização em autoclave a uma temperatura de 121°C por 30 minutos, para logo após sofrerem o processo de desinfecção, através de um detergente alcalino clorado (Quimistrol

Su 359-Lever Industrial), onde permaneceram por aproximadamente uma hora, sendo subsequentemente lavados com água destilada.

Os utensílios sensíveis ao calor foram também submetidos a ação do Quimistrol Su 359 pelo mesmo período anteriormente citado. Logo a seguir, os mesmos foram lavados e novamente submetidos e este tratamento por mais duas vezes consecutivas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da contaminação dos queijos Minas frescal comercializados.

Através da metodologia aplicada para detecção e isolamento de *Listeria* spp., foi possível obter 199 isolados de 20 queijos adquiridos no comércio de Campinas (SP) (Tabela 3). Destes isolados, 68 (34,17%) foram confirmados como *Listeria monocytogenes*, 92 (46,23%) *Listeria innocua*, 17 (8,54%) *Listeria welshimeri*, 1 (0,5%) *Listeria seeligeri* e 21 (10,56%) não foram identificados como pertencentes ao gênero *Listeria* (Tabela 4 e 5). Das 20 amostras de queijos Minas frescal analisadas, 5 (25%) estavam contaminadas com *Listeria monocytogenes* (A, D, F, N e O), 8 (40%) com *Listeria innocua* (A, B, F, N, O, P, Q e Z), 4 (20%) com *Listeria welshimeri* (A, B, O e P) e 1 (5%) com *Listeria seeligeri* (Q). Em uma mesma amostra foram detectadas diferentes espécies do mesmo gênero (Tabela 4).

Dentre os 68 isolados confirmados como *Listeria monocytogenes*, é importante ressaltar que 67 deles eram oriundos de queijos comercializados nos supermercados da região, enquanto os queijos provenientes de feiras livres apresentaram 63 de seus isolados caracterizados como sendo *Listeria innocua*.

Os resultados oriundos da contagem, mostraram alta concentração (média=1,76x10⁴ UFC/g) de *Listeria monocytogenes* em somente 3 amostras: D, F e N (Tabela 6) nas amostras A e O a contagem foi <10 UFC/grama, no entanto, nelas foi detectada *Listeria monocytogenes*. Nas 15 amostras restantes, esta espécie não foi quantificada através da metodologia de enumeração no meio MOX e nem através do enriquecimento da amostra. Destro (1990) indica que em amostras causadoras de listeriose humana, tem sido relatados níveis de 10²-10⁵ UFC/g

Vinte e um isolados inicialmente reconhecidos, através da luz transmitida, como *Listeria* spp. em meio de cultura TSA-YE foram identificados como pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Staphylococcus* e *Brochothrix* (Tabela 5). Estes microrganismos foram isolados de meios seletivos para *Listeria* como MOX, OXA e LPM e identificados através da metodologia descrita pelo Manual de Bergey (SNEATH et al., 1986).

O presente estudo revelou uma alta incidência de *Listeria monocytogenes* nas amostras obtidas na região de Campinas (SP) e procedentes de diferentes regiões dos Estados de São Paulo e de Minas Gerais (Tabela 3). Em diversas pesquisas, a contaminação das amostras de queijos alcançou valores percentuais menores do que o encontrado neste trabalho, que corresponderam a: 10,14% (BECKERS et al., 1987); 10,36% (PINI & GILBERT, 1988); 4,25% (MASSA et al., 1990); 10% (DESTRO et al., 1991); 2% (GENIGEORGIS et al., 1991); 11% (RORVIC & YNDESTAD, 1991); 18% (EL MARRAKCHI et al., 1993) e 6,6% (FURLANETTO et al., 1996). Dois destes estudos (DESTRO et al., 1991 e FURLANETTO et al., 1996), tiveram como objetivo avaliar o grau de contaminação de bactéria do gênero *Listeria* em queijos Minas frescal, o que vem de encontro ao intuito deste trabalho. No entanto, é importante ressaltar, que em todas as publicações acima relacionadas, foram aplicadas diferentes metodologias de isolamento para *Listeria* spp. Com exceção do último trabalho citado, todos os outros não aplicaram o duplo enriquecimento para recuperação deste microrganismo.

Neste trabalho quando foi utilizada a metodologia de isolamento, que inclui o duplo enriquecimento, foi possível encontrar *Listeria monocytogenes* em 25% das amostras de queijo Minas frescal analisadas. Quando o mesmo procedimento de isolamento foi aplicado em queijos Minas frescal, fabricados na cidade do Rio de Janeiro (RJ), este mesmo microrganismo foi encontrado em 41,17% das amostras estudadas (SILVA et al., 1998).

Tabela 3. Procedência dos isolados obtidos de amostras de queijos Minas frescal com as características morfológicas e de colônia de *Listeria* spp.

Amostra	Procedência	Nº de isolados	Dias após data de fabricação	Tempo de validade	Aquisição
A	Minas Gerais	14	6	30 dias	Feira livre
B	Minas Gerais	18	2	30 dias	Feira livre
C	Minas Gerais	3	7	20 dias	Supermercado
D	São Paulo	33	8	20 dias	Supermercado
E	Minas Gerais	2	15	20 dias	Supermercado
F	São Paulo	32	15	20 dias	Supermercado
G	Minas Gerais	zero	9	20 dias	Supermercado
H	Minas Gerais	zero	6	20 dias	Feira livre
I	São Paulo	zero	15	20 dias	Supermercado
J	Minas Gerais	zero	3	30 dias	Feira livre
K	Minas Gerais	1	3	30 dias	Feira livre
L	Minas Gerais	1	2	30 dias	Feira livre
M	Minas Gerais	zero	2	30 dias	Supermercado
N	Minas Gerais	16	2	30 dias	Supermercado
O	São Paulo	9	16	30 dias	Supermercado
P	São Paulo	22	16	30 dias	Supermercado
Q	Minas Gerais	11	6	30 dias	Feira livre
R	Minas Gerais	2	2	30 dias	Feira livre
S	Minas Gerais	2	2	30 dias	Feira livre
Z	Minas Gerais	33	13	30 dias	Feira livre

Tabela 4. Identificação bioquímica de *Listeria* spp. isoladas de amostras de 20 queijos Minas frescal comercializados na região de Campinas (SP).

Códigos	Identificação dos isolados*
A1; A10; A22-A25; A29; A30; A34; A36; B19-B28; B34-B36; F34; N28-N34; O28; O36; P10; P13; P19-P21; P23-P36; Q1; Q4; Q19-Q24; Q26; Q27; Z1-Z7; Z11-Z33	<i>Listeria innocua</i>
A27; D1-D2; D4-D16; D18-D26; D28-D36; F1; F2; F4; F6-F12; F14; F19-F25; F27; F29; F31-F33; F36; N19-N23; N25; N26; N35; N36; O32	<i>Listeria monocytogenes</i>
A26; A28; A35; B29-B33; O29-O31; O33-O35; P11; P12; P22	<i>Listeria welshimeri</i>
Q25	<i>Listeria seeligeri</i>

*Identificação através de Análises Bioquímicas e API Listeria

Tabela 5. Microrganismos isolados de amostras de 20 queijos Minas frescal comercializados na região de Campinas (SP).

Linhagens	Número de isolados identificados	Porcentagem de isolados
<i>Listeria monocytogenes</i>	68	34,17
<i>Listeria innocua</i>	92	46,23
<i>Listeria welshimeri</i>	17	8,54
<i>Listeria seeligeri</i>	1	0,5
<i>Lactococcus lactis</i>	7	3,52
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	5,03
<i>Brochothrix thermophacta</i>	4	2,01

Tabela 6. Enumeração de *Listeria monocytogenes* (UFC/grama) em amostras de queijos Minas frescal em meio MOX

Amostra A	Amostra D	Amostra F	Amostra N	Amostra O
<10	$1,8 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	<10

Este fato vem reforçar a importância do duplo enriquecimento no isolamento de *Listeria* spp. FURLANETO et al. (1996), apesar de terem aplicado Caldo Frasier (enriquecimento secundário), como utilizado neste trabalho, relataram uma baixa recuperação (6,6%) de *Listeria monocytogenes*. Porém, o tempo de incubação foi reduzido (somente 24 horas) durante o enriquecimento primário, o que pode ter ocasionado baixa recuperação das células injuriadas.

A alta incidência de *Listeria monocytogenes* encontrada nos queijos Minas frescal analisados neste trabalho, pode ser explicada por 3 razões básicas: pela possível utilização do leite cru não pasteurizado no processamento, e/ou ausência de higiene e prevenção contra contaminações do produto final e/ou pela contaminação cruzada que, muitas vezes ocorre entre o produto final e os equipamentos de manuseio na área de processamento. O queijo Minas frescal pode ser facilmente contaminado pela *Listeria* spp., considerando que suas fontes de contaminação incluem vegetais deteriorados, solo, água e efluentes que podem contaminar as rações, ocasionando infecções em animais domésticos ou de campo. A *Listeria monocytogenes* pode entrar no processamento de alimentos, através de produtos crus como aves, carnes, leites e outros. A presença deste patógeno nas indústrias processadoras de alimentos (CANILLAC & MOUREY, 1993 e MENEDEZ et al., 1997), particularmente em biofilmes nas superfícies de preparo, pisos e linha de processamento, pode ser explicada pela capacidade deste microrganismo crescer em baixa atividade de água a 5°C (MILLER et al., 1997).

Apesar de *Listeria monocytogenes* ter sido isolada em 5 (A, D, F, N e O) dos 20 queijos analisados, outros 4 queijos (B, P, Q e Z) continham outras espécies deste mesmo gênero. Isto indica que este alimento, quando contaminado, é um excelente substrato possibilitando a sobrevivência e multiplicação de *Listeria*, o que constitui um risco de saúde pública, quando ingeridos nestas condições. Este fato foi observado nos queijos D, F e N que, mesmo sem terem sido submetidos ao enriquecimento, apresentaram um nível de contaminação (média = $1,76 \times 10^4$ UFC/grama), que poderia comprometer a saúde dos consumidores. SCHOTHORST (1996), no seu plano de amostragem, quando não existem dados de HACCP disponíveis, cita que em situações onde o produto tem sido epidemiologicamente ligado com listeriosis e tem potencial de multiplicação na estocagem, distribuição e uso, devem ser analisadas 20 amostras e o lote deve ser rejeitado, se quaisquer das amostras contiver um número maior ou igual a 100 UFC/grama, no ponto de consumo.

De acordo com os padrões brasileiros (planos de amostragem para alimentos), anexo II da portaria 451/97, a tolerância de *Listeria monocytogenes* para queijos Minas frescal é zero (BRASIL, 1997). Este dado vem corroborar com as Normas do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1996). **Portanto, medidas de controle de *Listeria* spp. têm que ser efetivamente implementadas no preparo e processamento deste tipo de queijo, para aplicação desse padrão.**

Foi observado, também, o crescimento em placas de outras bactérias pertencentes aos gêneros *Staphylococcus*, *Brochothrix* e *Lactococcus*. Este fato, demonstra que os meios MOX, OXA e LPM, apesar de serem seletivos para *Listeria* spp., possibilitam ainda o crescimento de outros microrganismos.

4.2. Avaliação de meios de cultura para enumeração de *Listeria monocytogenes* Scott A não injuriada e termicamente injuriada.

Os resultados obtidos da avaliação dos 3 meios de cultura TSA, MOX e TSAP-YE podem ser observados nas Tabelas 7 e 8.

O número de células não injuriadas recuperadas nos meios de cultura estudados (TSA-YE, TSA-YE e MOX) foi praticamente igual ao inóculo inicial, adicionados em cada um dos tubos que continham leite desnatado estéril (Tabela 7). Dessa forma, os três meios estudados podem ser considerados equivalentes na recuperação de células não injuriadas. Esses resultados vem confirmar o que foi descrito por BUCHANAN et al. (1988), que ao testarem diferentes tipos de meio de cultura (meios seletivos e não seletivos), para a contagem de *Listeria monocytogenes*, demonstraram que em todos os meios estudados os resultados foram similares.

Na enumeração de células de *Listeria monocytogenes* Scott A termicamente injuriada à 56°C por 20 minutos (Tabela 8), os meios de plaqueamento TSA-YE e TSAP-YE, apresentaram o número de células reduzido em um ciclo logarítmico, em relação ao inóculo inicial no leite. Para o outro meio de cultura testado (MOX), ocorreu uma queda de dois ciclos decimais no número de células recuperadas, quando comparado a concentração inicial de microrganismos no experimento.

Tabela 7. Enumeração de células não injuriadas de *Listeria monocytogenes* Scott A (UFC/ml), intencionalmente inoculadas em leite desnatado estéril, em diferentes meios de cultivo.

Concentração no leite (UFC/ml)	TSA-YE (UFC/ml)	MOX (UFC/ml)	TSAP-YE (UFC/ml)
10 ¹	4,5 x 10 ¹	4,0 x 10 ¹	4,2 x 10 ¹
10 ²	3,4 x 10 ²	3,7 x 10 ²	3,0 x 10 ²
10 ³	3,3 x 10 ³	3,3 x 10 ³	3,6 x 10 ³
10 ⁶	3,5 x 10 ⁶	3,4 x 10 ⁶	3,6 x 10 ⁶

Tabela 8. Enumeração de células termicamente injuriadas (56°C/20 minutos) de *Listeria monocytogenes* Scott A (UFC/ml), intencionalmente inoculadas em leite desnatado estéril, em diferentes meios de cultura.

Concentração no leite (UFC/ml)	TSA-YE (UFC/ml)	MOX (UFC/ml)	TSAP-YE (UFC/ml)
10 ¹	< 10 ¹	< 10 ¹	< 10 ¹
10 ²	3,0 x 10 ¹	< 10 ²	3,0 x 10 ¹
10 ³	2,8 x 10 ²	1,0 x 10 ¹	2,6 x 10 ²
10 ⁶	1,6 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁵

Os resultados de contagem obtidos nos meios de cultura TSA-YE e TSAP-YE apresentaram-se similares, tanto na recuperação de células não injuriadas como também na recuperação dos microrganismos termicamente injuriados. A adição do piruvato de sódio em TSAP-YE, teve como objetivo verificar a recuperação das células frente a este suplemento, já que o papel do piruvato consiste da remoção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) acumulado pelas células, que estão sob injúrias ou já injuriadas (SMITH, 1990). Alguns trabalhos tem demonstrado que a adição do piruvato ao meio de cultura aumentou a recuperação de alguns microrganismos termicamente injuriados, tais como *Staphylococcus aureus* (BAIRD-PARKER & DAVENPORT, 1965; HURST et al., 1976 e BREWER et al., 1977), *Salmonella typhimurium* (D'AOUST, 1978) e *Listeria monocytogenes* (SMITH & ARCHER, 1988). No entanto, DALLMIER & MARTIN (1988) discordaram da eficácia, quando demonstraram que nem a adição do piruvato ou catalase, ou mesmo a incubação de células em anaerobiose, aumentou o número de microrganismos em meio de cultura ágar de soja tripticase (TSA) ou TSA suplementado com cloreto de sódio. Esses resultados foram reforçados por BUCHANAN et al. (1988) que, ao testarem diferentes meios de cultura, concluíram que o ágar Columbia CNA (meio não seletivo) e o ágar triptose fosfato com 1% de piruvato (TPAP) foram equivalentes na recuperação de células termicamente injuriadas.

Neste trabalho, a redução na recuperação de células foi mais acentuada no meio MOX, comprovando o que foi descrito por BUCHANAN et al. (1988). Estes autores afirmaram que, a maioria dos meios seletivos, não é ideal na recuperação de células expostas a certos tipos de estresses subletais, como aquecimento, congelamento, acidificação ou desidratação. Nestes casos, a espécie alvo tornou-se sensível aos agentes seletivos como resultado do choque subletal. A enumeração direta de células expostas a estas condições pode levar a detecção de uma pequena porção do número total de células.

As células de *Listeria monocytogenes* submetidas a injúria térmica não crescem, ou não formam colônias, na presença de certos agentes seletivos utilizados no meio de cultura,

tais como feniletanol, acriflavina, telurito de potássio, sulfato de polimixina B, tiosulfato de sódio, cloreto de sódio ou a combinações destes compostos (BUCHANAN et al., 1988; SMITH & ARCHER, 1988 e SMITH, 1990). De acordo com RYSER & MARTH (1991a), quando a seletividade do meio de cultura é aumentada, ocorre uma diminuição na recuperação de células estressadas. O meio MOX possui em sua formulação dois antibióticos colistina e moxalactam. A colistina atua sobre as bactérias Gram-negativas, incluindo *Proteus* e *Pseudomonas* e algumas Gram-positivas como *Staphylococcus* (LEE & McClain, 1986 e RYSER & MARTH, 1991a). Além destes, o cloreto de lítio presente neste meio de cultura tem ação contra bactérias Gram-negativas (com exceção de *Pseudomonas*). Desse modo, esses agentes seletivos podem ter afetado de alguma forma a recuperação de células termicamente injuriadas, uma vez que a formação de colônias neste meio foi menor do que as enumeradas em TSA-YE e TSAP-YE. Portanto, o meio selecionado para as etapas posteriores da pesquisa foi TSA-YE (4.3. e 4.4.).

4.3. Determinação da curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* Scott A em meio não seletivo.

A curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* Scott A à 35°C, em meio não seletivo, pode ser observada na Figura 5. Nessa temperatura, o tempo da fase lag foi de aproximadamente 90 minutos. A população de *Listeria monocytogenes* alcançou seu nível máximo ($2,80 \times 10^9$ UFC/ml) aos 690 minutos (11 horas e 30 minutos) de incubação e o tempo de geração (g) encontrado para esse microrganismo à 35°C foi 43 minutos. Este tempo encontrado, foi calculado através dos dados obtidos durante a fase exponencial (MADIGAN et al., 1997).

ROSENOW & MARTH (1987), demonstraram que o tempo de geração encontrado para *Listeria monocytogenes* V7 (linhagem isolada do leite) foi de 41 minutos nas amostras de leite desnatado, integral, achocolatado e creme de leite, incubadas à 35°C. No presente estudo, o tempo de geração encontrado para *Listeria monocytogenes* Scott A foi de 43

minutos, tempo este bastante próximo ao valor obtido por ROSENOW & MARTH (1987). No entanto, estes pesquisadores, relataram que a população máxima obtida de 10^9 células/ml, só foi detectada em leite achocolatado, enquanto nas outras amostras esse valor foi menor. Considerando que a temperatura de incubação (35°C) foi a mesma nos dois experimentos, a diferença nos tempos de geração pode ter sido causada tanto pela composição dos diferentes substratos utilizados para o crescimento de *Listeria monocytogenes*, como pelas diferentes linhagens estudadas.

O valor da inclinação da curva de crescimento na fase exponencial considerando a faixa entre os pontos 90 e 510 minutos foi 0,007. Com um R^2 de 0,99, obtido mediante a regressão linear. O mesmo resultado foi obtido quando foram avaliados os pontos 90 e 600 minutos.

Com os resultados obtidos da curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* Scott A (tempo x log do número de células) foi selecionado o tempo de nove horas de incubação (540 minutos), que correspondeu ao final da fase logarítmica com $1,37 \times 10^9$ UFC/ml. O objetivo dessa escolha foi padronizar o inóculo, para o estudo da resistência térmica (3.2.4.1.).

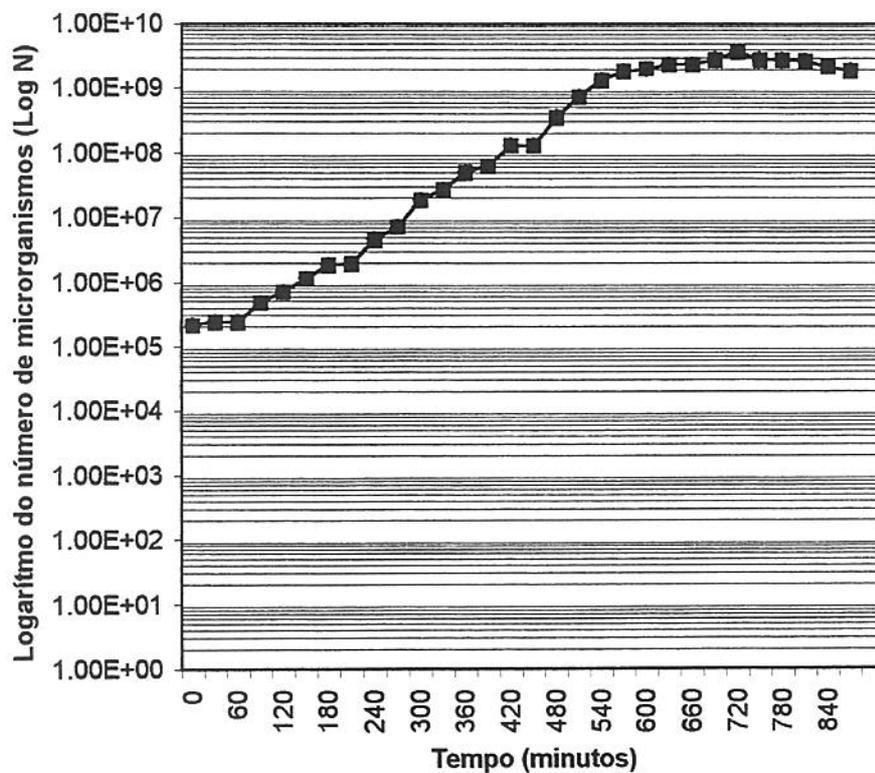


Figura 5. Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* Scott A em meio não seletivo (TSB-YE) à 35°C.

4.4. Determinação da resistência ao calor e ao tratamento conjugado calor-nisina em leite integral estéril.

Na Tabela 9, pode ser observado que o valor D de *Listeria monocytogenes*, em leite cru, variou entre 0,155 e 2113,237 segundos, dependendo do tratamento aplicado. Os cálculos realizados para os valores D, mediante regressões lineares para todos os tratamentos, encontram-se no Apêndice 4, conjuntamente, com as curvas de sobrevivência utilizando o Excel (versão 1997). Como já previsto, quando as temperaturas utilizadas foram 52 e 55°C, os valores D obtidos foram maiores do que em outras temperaturas

estudadas. Pode ser notado, também, que a 55°C os valores de D foram altos, indicando uma alta resistência ao calor, mesmo em diversas concentrações de nisina (42,7 e 7,3UI/ml).

A 60°C e 25 UI de nisina/ml, foram realizados oito experimentos, determinados de ponto central do desenho experimental original (Tabela 9). Neste caso, a média obtida, a partir dos valores D encontrados, foi de 42,83 segundos e a faixa de variação ficou entre 34,498 e 50,113 segundos. Este dado é semelhante ao obtido por MAISNIER-PATIN et al. (1995) que observaram um valor D de 40,2 segundos, quando os mesmos parâmetros (temperatura e concentração de nisina) foram aplicados em leite desnatado. Nesta mesma temperatura, quando a concentração de nisina foi duplicada (50 UI/ml), o valor D diminuiu praticamente 50% (22,389 segundos), quando comparado a média obtida para 25UI/ml descrita acima.

É importante observar nos tratamentos 5, 6, 11, o efeito da redução da resistência térmica de *Listeria monocytogenes* em leite integral estéril. Assim, no tratamento 11 o valor de $D_{60^{\circ}\text{C}}$ foi 99 segundos sem adição de nisina. No tratamento 5 o $D_{60^{\circ}\text{C}}$ com 25 UI de nisina foi de 34 segundos, representando uma redução de 66% na resistência. Quando 50 UI de nisina foram adicionadas e o leite aquecido a 60°C, observou-se uma redução de 78% da resistência térmica da *Listeria monocytogenes* Scott A., quando comparada ao tratamento sem nisina. Estas porcentagens demonstraram claramente a vantagem da utilização de nisina na pasteurização do leite.

A 66°C, o efeito da concentração de nisina persistiu (tratamentos 2 e 3). No entanto, este efeito foi menos acentuado do que aquele verificado em temperaturas mais baixas.

Quando 68°C foi utilizado, o valor D foi muito baixo (0,1555 segundos). Neste caso, o efeito da temperatura foi predominante, estando de acordo com o que foi descrito por WHITING et al. (1994).

Tabela 9. Desenho experimental para combinação de diferentes condições: concentração de nisina, temperatura e resposta experimental (Valor D) para *Listeria monocytogenes* Scott A

Tratamento	Nisina (UI/ml)	Temp (°C)	R ²	Valor D (seg.)
01	25	68	0,9947	0,155
02	7,3	66	0,9933	6,725
03	42,7	66	0,9972	4,817
04	25	52	0,9921	699,982
05	25	60	0,9853	34,498
06	50	60	0,9872	22,389
07	25	60	0,9377	37,130
08	25	60	0,9889	46,646
09	42,7	55	0,9956	404,342
10	25	60	0,9200	41,346
11	0	60	0,9993	99,435
12	25	60	0,9680	48,386
13	25	60	0,9620	50,113
14	25	60	0,9947	41,120
15	25	60	0,9887	43,426
16	7,3	55	0,9886	2113,237

Em uma primeira análise realizada através do Programa Estatístico-S.A.S.(1998), foi observado que três tratamentos experimentais (4, 9 e 16) apresentaram pontos que prejudicam o ajuste da curva aos dados. Estes tratamentos correspondem a situações onde a temperatura é baixa, observando-se valores D altos. A influência da baixa temperatura é forte nesses pontos aumentando o número de sobreviventes. Para avaliar as respostas encontradas, os dados foram transformados em logaritmos. Diante das respostas obtidas, e

considerando que o objetivo deste trabalho era encontrar um tratamento de pasteurização e uma concentração de nisina que minimizasse a resistência térmica da *Listeria monocytogenes* Scott A, em termos de valor D, foi realizado uma segunda análise estatística, sem considerar os tratamentos experimentais números 4, 9 e 16. Nesta última análise, não foi necessário a transformação das respostas como anteriormente e dessa forma, foi possível obter um modelo matemático que permite interpolação na região testada (Equação 1).

$$\text{VALOR D} = 5590,743011 - 17,857553 \text{ CONC} - 162,102213 \text{ TEMP} + 0,028926 \text{ CONC}^2 + 0,247839 \text{ TEMP} * \text{CONC} + 1,176340 \text{ TEMP}^2 \quad (\text{Equação 1}).$$

Onde:

CONC = Concentração de nisina TEMP = Temperatura de pasteurização.

Equação 1. Modelo matemático para a determinação da resistência térmica mínima de *Listeria monocytogenes* Scott A em leite cru, em função da temperatura e concentração de nisina adicionada.

O modelo quadrático de superfície de resposta apresentou um ajuste muito bom com $R^2 = 0,9739$ porém, trata-se de uma aproximação de segunda ordem, para o relacionamento verdadeiro entre D, temperatura e concentração de nisina. Como o valor D mínimo não foi encontrado no espaço experimental, foram calculados os mínimos em cada distancia fixada do centro do experimento isto é, foi traçado o caminho dos mínimos valores de D, para auxiliar na tomada de decisões (análise de "ridge"). Na Tabela 9, estão calculados os valores de D obtidos experimentalmente. Esses valores de D foram comparados com os valores D preditos pelo modelo matemático (Tabela 10). Os diversos tratamentos do plano experimental apresentaram uma diminuição da fração de *Listeria monocytogenes* Scott A sobreviventes em relação ao tempo, como pode ser verificado na Figura 6. O caminho dos mínimos pode ser observado na Figura 7, que considerou as variáveis concentração de nisina

(UI/ml) e temperatura (°C). Cada temperatura corresponde a uma concentração de nisina, que produz uma mesma resistência térmica em termos de valor D e na Equação 1 tem-se o modelo quadrático encontrado. No Apêndice 3 está incluído a análise estatística do ajuste da superfície quadrática e sua análise canônica e de acordo com o resultado do teste de T, foram significativos ($\leq 0,05\%$) termos concentração de nisina e temperatura, suas respectivas combinações e também, os termos quadráticos, temperatura ao quadrado e concentração de nisina ao quadrado.

Os valores mínimos de D foram estimados pela Equação 1 e constam na Tabela 11, com seu erro padrão e as concentrações de nisina e temperatura correspondentes; mostrando o mais rápido decréscimo da resposta em sentido radial, desde temperatura igual a 64°C e nisina igual a 25UI/ml. Considerando que o D mínimo está fora do espaço experimental, foi escolhido um valor menor (64,4°C e 26,4UI de nisina), que poderia ser testado.

Através da Equação 1 é possível prever a resistência térmica da *Listeria monocytogenes* Scott A, se a temperatura de pasteurização e a concentração de nisina a ser adicionada for conhecida. Esta relação no entanto, é válida dentro do espaço experimental testado de 60 a 68°C e de 0 a 50 UI de nisina/ml. WHITING (1993), apresentou um modelo secundário para estimar o tempo para atingir 4 reduções decimais de *Listeria monocytogenes*. Estas reduções, segundo o autor, seriam suficientes para eliminar o patógeno presente em produtos processados, se boas práticas de produção ("GMP") forem cumpridas. Este modelo apresenta também, termos quadráticos de temperatura, concentrações de sal e nitrito, pH e combinações destes fatores, com um coeficiente de correlação de 0,86. Dados os valores D calculados por este modelo foram comparados com dados da literatura, para demonstrar que o modelo de inativação era razoável e precisava de ajustes com o modelo de crescimento. Outros modelos preditivos têm sido desenvolvidos, principalmente, para o crescimento de *Listeria monocytogenes*, em função de vários fatores como temperatura, pH, ácidos láctico e acético (GEORGE et al., 1996) e temperatura de es-

Tabela 10. Comparação dos valores D preditos para *Listeria monocytogenes* Scott A pelo modelo e os valores observados experimentalmente.

Tratamento	Nisina (UI/ml)	Temperatura (°C)	Valor D Predito*	Valor D observado
05	25	60	42,833	34,498
07	25	60	42,833	37,130
08	25	60	42,833	46,646
10	25	60	42,833	41,346
12	25	60	42,833	48,386
13	25	60	42,833	50,113
14	25	60	42,833	41,120
15	25	60	42,833	43,426
Média			42,833	42,833
01	25	68	0,156	0,155
02	7,3	66	6,725	6,725
03	42,7	66	4,824	4,817
04	25	52	236,082	699,982
06	50	60	22,389	22,389
09	42,7	55	103,096	404,342
11	0	60	99,434	99,435
16	7,3	55	204,238	2113,237

* estimado pela equação 1

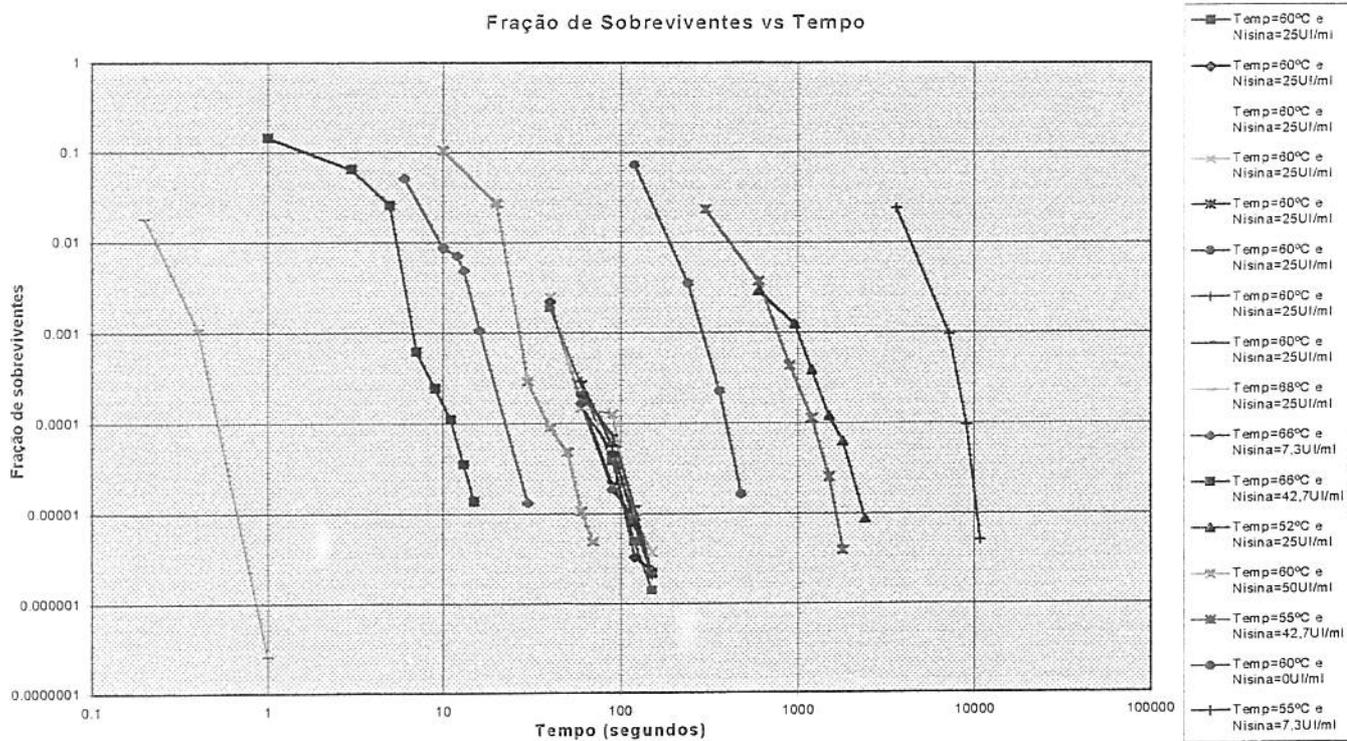


Figura 6. Fração de sobreviventes (*Listeria monocytogenes* Scott A) versus tempo (segundos) para os diversos tratamentos do plano experimental.



Figura 7. Superfície de Resposta utilizando os valores D (segundos) obtidos para *Listeria monocytogenes* Scott A, em leite integral estéril, com as variáveis concentração de nisina (UI/ml) e temperatura (°C)

Tabela 11. Caminho dos mínimos estimados para a variável resposta valor D (segundos) de *Listeria monocytogenes* Scott A.

Resposta mínima estimada Valor D (seg.)	Erro padrão (seg.)	Concentração de nisina UI/ml	Temperatura (°C)
2,672816	6,528900	25,000000	64,000000
2,422010	6,516911	25,134530	64,033715
2,177168	6,503826	25,267377	64,067601
1,938281	6,489636	25,398440	64,101666
1,705333	6,474330	25,527608	64,135918
1,478313	6,457895	25,654765	64,170367
1,257203	6,440318	25,779784	64,205021
1,041988	6,421587	25,902528	64,239890
0,832650	6,401685	26,022851	64,274985
0,629171	6,380598	26,140597	64,310315
0,431529	6,358308	26,140597	64,310315
0,239701	6,3344799	26,367667	64,381726
0,053664	6,310051	26,476615	64,417830
-0,126609	6,284043	26,582231	64,454215
-0,301146	6,256756	26,684292	64,490894
-0,469979	6,228166	26,7825558	64,527878

tocagem, pH, concentrações de nitrito de sódio e NaCl (McCLURE et al.,1997). Mais recentemente, PYASENA et al. (1998) desenvolveram um modelo linear de inativação de *Listeria* spp. a alta temperatura e curto tempo, em um pasteurizador em escala piloto. Nenhum destes modelos leva em conta a concentração de nisina como coadjuvante térmico.

Para validar o modelo matemático, um dos tratamentos dentre os valores mínimos estimados para D foi escolhido, neste caso, o tratamento selecionado foi 64,38°C e 26,36UI de nisina/ml, com uma resposta de 0,23 segundos de valor D (Tabela 11). Aqueles tratamentos cujas respostas estimadas foram negativas não foram considerados, levando em conta, que os valores D são tempos e não podem ser negativos. Quando foi realizado um teste experimental utilizando 64,4°C e concentração de nisina de 26,4 UI/ml, o valor D obtido foi 0,26 segundos dentro de uma faixa experimental, que variou entre 0,20 a 0,37 segundos com $R^2 = 0,9743$. Um tratamento térmico de 2,3 segundos, que corresponde a redução logarítmica de 9D (D=0,26 segundos) para *Listeria monocytogenes*, é designado para eliminar 10^5 UFC/ml em leite integral, para produção do queijo Minas frescal à temperatura de 64,4°C e 26,4 UI/ml de nisina. A vantagem deste tempo reduzido de pasteurização é a destruição deste patógeno, sem comprometer ou afetar as propriedades físico-químicas do leite utilizado no processamento do queijo. Por outro lado, a baixa concentração de nisina utilizada torna o tratamento também de baixo custo, sendo acessível para indústrias de pequeno e médio porte. Além disso, o processo pode causar destruição do microrganismo sem grandes gastos de energia, devido a baixa temperatura e tempo de processamento aplicados

Como a combinação entre nisina e temperatura tem demonstrado ter grande efeito sobre a resistência térmica de *Listeria monocytogenes* Scott A, é muito importante demonstrar isso e tornar este procedimento como rotina no controle do patógeno estudado.

4.5. Aplicação do tratamento termoquímico em queijos Minas frescal

4.5.1. Análise do leite cru

A Tabela 12 apresenta as características físico-químicas dos 3 lotes de leite cru, que foram utilizados nos 4 processamentos dos queijos Minas frescal. O leite utilizado apresentou em média 3,25% de gordura, 1,0322g/ml (à 15°C) de densidade, 17,51 de acidez titulável (°D) e pH igual a 6,63.

Tabela 12. Caracterização físico-química do leite cru utilizado nos processamentos dos queijos Minas frescal

Processamento	Lotes	Gordura(%)	Densidade à 15°C(g/ml)	Acidez (°D)	pH
Primeiro	1	3,3	1,0322	17,23	6,58
Segundo	1	3,3	1,0322	17,23	6,58
Terceiro	2	3,25	1,0315	17,65	6,65
Quarto	3	3,2	1,0329	17,65	6,66

Na Tabela 13 podem ser observados os resultados referentes as análises microbiológicas realizadas no leite cru, destinados a fabricação dos queijos Minas frescal.

Tabela 13. Análises microbiológicas do leite cru utilizado nos diferentes processamentos dos queijos Minas frescal

Processamento	Lotes	<i>Listeria</i> spp. (UFC/ml)	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (UFC/ml)	Coliformes totais (NMP/ml)	Coliformes fecais (NMP/ml)	<i>Salmonella</i> spp. (em 25ml)
Primeiro ^o	1	ausente	3,2x10 ³	>7380	680	ausente
Segundo	1	ausente	2,25x10 ³	>7380	680	ausente
Terceiro	2	ausente	2,5x10 ³	>7380	1200	ausente
Quarto	3	ausente	6,5x10 ³	>7380	480	ausente

Todas as determinações físico-químicas realizadas no leite cru foram bastante similares (Tabela 12). Este fato pode ser atribuído a origem do leite, o qual foi ordenhado de um mesmo animal em uma mesma época do ano. Este animal foi selecionado e mantido sob condições diferenciadas de manejo, principalmente no que se refere a não utilização de antibióticos.

As determinações microbiológicas também se apresentaram similares (Tabela 13), com exceção do número mais provável (NMP) de coliformes fecais de uma amostra do terceiro processamento, que apresentou um número mais elevado desse microrganismo. O NMP de coliformes fecais pode ter sido maior do que aquele encontrado nas outras amostras, em decorrência de diversos fatores como por exemplo, falta de higiene na hora da ordenha (nas mãos do ordenhador, no úbere, baldes, etc.)

4.5.2. Análise dos queijos processados

Os resultados de pH, acidez titulável (% de ácido lático) e gordura encontrados durante a vida de prateleira dos queijos Minas frescal, processados com diferentes tratamentos, podem ser observados nas Tabelas 12 a 13.

As análises químicas (Tabelas 14 e 15) e as microbiológicas (Tabelas 18 e 19) referentes ao primeiro e segundo processamentos dos queijos Minas frescal, utilizaram o primeiro lote de leite. Os resultados descritos nas Tabelas 16 e 20 são provenientes dos queijos que foram fabricados com o segundo lote de leite enquanto, os encontrados na Tabelas 17 e 21 utilizaram como matéria-prima o leite do terceiro lote.

Tabela 14. Valores de pH, acidez titulável (% de ácido láctico) e de gordura durante a vida de prateleira das amostras de queijos Minas frescal fabricados com adição de 10^5 UFC de *Listeria monocytogenes* Scott A por ml de leite utilizado (Lote 1)

Dias	pH	Gordura (%)	Acidez titulável (% ácido láctico)
1	5,50	23	0,1838
7	5,30	—	0,2433
14	5,15	—	0,5719
21	5,10	22	0,6406

Tabela 15. Valores de pH, acidez titulável (% de ácido láctico) e de gordura durante a vida de prateleira das amostras de queijos Minas frescal contendo 10^5 UFC de *Listeria monocytogenes* Scott A e 26,4 UI de nisina por ml de leite utilizado (Lote 1)

Dias	pH	Gordura (%)	Acidez titulável (% de ácido láctico)
1	5,60	24	0,1850
7	5,50	—	0,1863
14	5,42	—	0,1934
21	5,40	23	0,1948

Tabela 16. Valores de pH , acidez titulável (% de ácido láctico) e de gordura(%) durante a vida de prateleira das amostras de queijos Minas frescal, contendo 26,4 UI de nisina por ml de leite utilizado (Lote 2)

Dias	pH	Gordura (%)	Acidez titulável (% de ácido láctico)
1	5,60	24,5	0,1846
7	5,52	24,25	0,1855
14	5,44	24,0	0,1928
21	5,40	24,0	0,1949

Tabela 17. Valores de pH , acidez titulável (% de ácido láctico) e de gordura (%) durante a vida de prateleira das amostras de queijos Minas frescal, sem adição no leite de nisina e de *Listeria monocytogenes* Scott A (Lote 3)

Dias	pH	Gordura (%)	Acidez titulável (% de ácido láctico)
1	5,67	24,25	0,1855
7	5,60	24,25	0,2349
14	5,45	23,9	0,5370
21	5,38	23,8	0,6041

Os resultados referentes as análises microbiológicas, tais como *Listeria monocytogenes* Scott A (UFC/g), *Staphylococcus* spp. (UFC/g), coliformes totais (NMP/g) coliformes fecais (NMP/g) e *Salmonella* spp. (detecção em 25 g de amostra) nos queijos Minas frescal, durante sua vida de prateleira, estão apresentados nas Tabelas 18 a 21.

Tabela 18. Análise microbiológica dos queijos Minas frescal, durante sua vida de prateleira, fabricados com adição de 10^5 UFC de *Listeria monocytogenes* Scott A por ml de leite utilizado (Lote 1)

Dias	<i>Listeria monocytogenes</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes fecais (NMP/g)	<i>Salmonella spp.</i> (em 25g)
1	$2,75 \times 10^3$	$3,5 \times 10^2$	1700	ausentes	ausente
7	$2,8 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$	1300	ausentes	ausente
14	$2,0 \times 10^3$	$3,5 \times 10^2$	1100	ausentes	ausente
21	$9,0 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$	900	ausentes	ausente

Tabela 19. Análise microbiológica dos queijos Minas frescal, durante sua vida de prateleira, adicionados de 10^5 UFC de *Listeria monocytogenes* Scott A e 26,4 UI de nisina por ml de leite utilizado (Lote 1)

Dias	<i>Listeria monocytogenes</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes fecais (NMP/g)	<i>Salmonella spp.</i> (em 25g)
1	ausente	ausente	ausentes	ausentes	ausente
7	ausente	ausente	ausentes	ausentes	ausente
14	ausente	ausente	ausentes	ausentes	ausente
21	ausente	ausente	ausentes	ausentes	ausente

Tabela 20. Análise microbiológica das amostras dos queijos Minas frescal, durante sua vida de prateleira, contendo 26,4 UI de nisina por ml de leite utilizado (Lote 2)

Dias	<i>Listeria monocytogenes</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes fecais (NMP/g)	<i>Salmonella spp.</i> (em 25g)
1	ausente	ausente	ausentes	ausentes	ausente
7	ausente	ausente	ausentes	ausentes	ausente
14	ausente	ausente	ausentes	ausentes	ausente
21	ausente	ausente	ausentes	ausentes	ausente

Tabela 21. Análise microbiológica das amostras dos queijos Minas frescal, durante sua vida de prateleira, sem adição de nisina e de *Listeria monocytogenes* Scott A (Lote 3)

Dias	<i>Listeria monocytogenes</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes fecais (NMP/g)	<i>Salmonella spp.</i> (em 25g)
1	ausente	$6,0 \times 10^2$	1600	ausentes	ausente
7	ausente	$5,5 \times 10^2$	1400	ausentes	ausente
14	ausente	$6,5 \times 10^2$	1200	ausentes	ausente
21	ausente	$6,0 \times 10^2$	1000	ausentes	ausente

Os valores de pH obtidos, nos 4 diferentes processamentos, diminuíram ao longo da vida de prateleira dos queijos Minas frescal (Tabelas 14 a 17). A queda mais acentuada, no valor de pH, ocorreu nos queijos produzidos com leite adicionado de *Listeria monocytogenes* Scott A (Tabela 14), alcançando um pH de 5,10, no vigésimo primeiro dia de vida de prateleira. Enquanto que, nos queijos mencionados nas Tabelas 15 e 16 os

valores de pH determinados foram iguais a 5,40, no último dia de estocagem, enquanto que para o queijo controle foi encontrado um valor mínimo de 5,38 (Tabela 17).

A queda dos valores de pH nos diferentes experimentos realizados certamente ocorreu devido a fermentação da lactose, pelos microrganismos contaminantes presentes nos queijos ou sobreviventes após o tratamento térmico do leite. Concomitantemente, a diminuição dos valores de pH houve um aumento dos valores de acidez titulável durante a vida de prateleira dos queijos Minas frescal, devido à produção de ácido láctico. O maior valor obtido foi 0,6406 (% de ácido láctico) no último dia de vida de prateleira dos queijos processados com adição de *Listeria monocytogenes* Scott A (Tabela 14).

As porcentagens de ácido láctico descritas nas Tabelas 16 e 17 mantiveram-se praticamente estáveis depois do primeiro dia de armazenamento à 7°C. Este fato indica que a cultura láctica deve ter sido inibida e/ou eliminada pela competição com *Listeria monocytogenes* Scott A e/ou nisina adicionada ao leite. De acordo com HURST (1972), HARRIS et al. (1989) e HARRIS et al. (1992) a nisina tem seu efeito bactericida sobre os microrganismos Gram-positivos incluindo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Staphylococcus aureus*, entre outros. FURTADO (1999) também mencionou que o uso da nisina é limitado para alguns queijos, por causa de sua ação contra os microrganismos das culturas lácticas. Segundo ROGERS (1928) a presença de nisina em queijos pode ser responsável pelo desenvolvimento de baixa acidez. Dessa forma, os queijos fabricados (Tabela 16 e 17) apresentaram um comportamento similar aos queijos fabricados sem fermento, como pode ser observado no trabalho descrito por CAMPOS (2000) que utilizou baixas concentrações (zero; 0,1% e 0,5%) de fermento láctico. Os valores de pH sofreram uma queda inicial logo após a fabricação dos queijos no entanto, pode-se constatar que esses valores tiveram uma queda mínima, depois do primeiro dia de estocagem. Isso provavelmente, deve ter ocorrido devido a inativação do fermento láctico. Sendo assim, a ação competitiva desse fermento, com os microrganismos presentes ou outros contaminantes pós-pasteurização ficou eliminada.

Apesar do pH ter seu papel de destaque, no controle de *Listeria monocytogenes* nos queijos processados, outros fatores como temperatura, nisina e concentração de sal (NaCl), influenciaram não somente na sobrevivência desse patógeno, como também no crescimento de outros microrganismos presentes nesse alimento em questão.

Na Tabela 18, foi verificado que o número de *Listeria monocytogenes* encontrado no primeiro dia de vida de prateleira dos queijos Minas frescal foi $2,75 \times 10^3$ /g do produto. Este número permaneceu, praticamente, constante até o sétimo dia de armazenamento. No décimo quarto dia, foi detectado uma pequena queda no número de sobreviventes e no vigésimo primeiro dia, a quantidade de *Listeria monocytogenes* encontrada foi $9,0 \times 10^2$ /g de alimento. Dessa forma, é possível afirmar que o tratamento térmico aplicado ao leite, para fabricação dos queijos ($64,4^\circ\text{C}/ 2,3$ segundos), não foi suficiente para eliminar o número de *Listeria monocytogenes* Scott A (10^5 UFC/ml), intencionalmente adicionada ao mesmo. Ocorreu apenas uma redução da carga microbiana deste patógeno nos queijos, quando armazenados a 7°C .

Neste mesmo processamento, o binômio tempo/temperatura aplicado de $64,4^\circ\text{C}$ e 2,3 segundos, também não foi suficiente para eliminar *Staphylococcus aureus* e coliformes totais, inicialmente presentes nos lotes de leite cru (Tabela 13). Todavia, esse tratamento foi efetivo sobre coliformes fecais; pois, os mesmos, não foram detectados nos queijos. O número de *Staphylococcus aureus* permaneceu, praticamente, constante ($3,5 \times 10^2$ UFC/g) durante os vinte e um dias de armazenamento, diferindo dos coliformes totais, que tiveram um constante decréscimo durante o período estudado, apresentando o número mais provável (NMP) igual a 900 microrganismos por grama de queijo, no último dia de armazenamento à 7°C .

Quando a nisina foi adicionada ao leite, em dois diferentes processamentos (Tabela 19 e 20), foi possível constatar a ausência de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*,

coliformes totais, coliformes fecais e *Salmonella* nos queijos fabricados e armazenados a 7°C, durante os vinte e um dias de vida de prateleira. Na Tabela 19, foi demonstrado que mesmo com adição da concentração de 10⁵ UFC de *Listeria monocytogenes* Scott A por mililitro de leite, esse patógeno não sobreviveu ao tratamento aplicado ao leite na fabricação dos queijos. Desta forma, os dados obtidos, permitem afirmar que o tratamento térmico aplicado ao leite, associado a adição de nisina, foi efetivo na eliminação dos microrganismos, inicialmente presentes no leite.

O pH também teve seu papel de destaque sobre a sensibilidade desses microrganismos frente à ação bactericida da nisina. De acordo com UKUKU e SHELEF (1997) a sensibilidade da *Listeria monocytogenes* à nisina é dependente de cada linhagem e é aumentada com a diminuição do pH. O trabalho de HARRIS et al. (1991) veio comprovar esta afirmação, quando estudaram o efeito da nisina e de diferentes valores de pH, sobre a sensibilidade de *Listeria monocytogenes* Scott A. Neste caso, o ágar BHI adicionado de zero a 50 UI de nisina/ml foi ajustado a diferentes valores de pH (6,5 e 5,5) e inoculado com 10⁹ UFC/ml. Os resultados demonstraram que em pH 6,5, quando 10 UI de nisina/ml foram utilizadas, o número colônias de *Listeria monocytogenes* Scott A foi reduzido de 5 ciclos logarítmicos, enquanto que, para 25 UI de nisina /ml a redução foi ao redor de 6 ciclos logarítmicos. Em pH 5,5, a queda de sobreviventes foi ainda maior, isto é, 10⁸ e 10⁹ ciclos logarítmicos, para concentrações de 10 e 25 UI de nisina, respectivamente. Como no presente trabalho, a concentração de nisina adicionada ao leite foi 26,4 UI/ml e o pH dos queijos ficou dentro de uma faixa que variou de 5,60 a 5,10, é possível, que esses valores de pH tenham potencializado a ação da nisina sobre *Listeria monocytogenes*.

Como a nisina possui ação bactericida sobre as bactérias Gram positivas e a concentração de 26,4 UI/ml de leite, mais o tratamento térmico (64,4°C/2,3 segundos) conseguiram eliminar 10⁵UFC de *Listeria monocytogenes* Scott A (propositalmente adicionada) por ml de leite; certamente, esse tratamento aplicado conseguiu também, eliminar outra bactéria Gram positiva, como foi o caso do *Staphylococcus aureus*, cuja

concentração inicial nos lotes de leite era de 10^3 UFC/ml (Tabela 13). Segundo ZOTTOLLA et al. (1994), a nisina quando utilizada no processamento de queijos, possui efeito imediato sobre as células de *Staphylococcus aureus*, cessando ou diminuindo seu crescimento. Portanto, é possível que o tratamento térmico utilizado, tenha potencializado o efeito desta bacteriocina. No entanto, foi interessante verificar que esse tratamento, conjugando tempo, temperatura e concentração de nisina também foi eficaz sobre bactérias Gram negativas, presentes inicialmente no leite, como por exemplo, coliformes totais (Tabela 13). Desse modo, este trabalho veio confirmar o que foi descrito por GAO et al. (1991), HARRIS et al. (1992), KALCHAYANAND et al. (1992) e CARNEIRO-DE-MELO et al. (1996), quando afirmaram que, as células Gram negativas quando injuriadas (choque osmótico ou qualquer tipo de procedimento que afete seu componente lipopolissacáride-LPS) tornam-se sensíveis a nisina. De acordo com ABEE et al. (1995) os trabalhos realizados por STEVENS et al. (1991) e RAY (1993), demonstraram que espécies de *Salmonella* e outras bactérias Gram negativas tornaram-se sensíveis à nisina, depois de expostas a tratamentos que modificaram a permeabilidade da membrana externa. Esta afirmação também foi comprovada por KALCHAYANAND et al. (1992) que demonstraram que bactérias Gram negativas e algumas Gram positivas resistentes a bacteriocinas, quando submetidas a estresses subletais e tratadas com nisina ou pediocina AcH tornam-se sensíveis as mesmas. Neste sentido, é possível admitir que a temperatura, certamente, deve ter afetado de alguma forma, a permeabilidade da parede celular de *Staphylococcus aureus* e coliformes presentes no leite.

Foi observado também que os coliformes fecais, apesar de terem sido detectados no leite cru, não foram encontrados em nenhum dos queijos durante o armazenamento à temperatura de 7°C (Tabelas 18 a 21). Isso demonstrou, que esses microrganismos, foram mais sensíveis ao tratamento térmico e/ou competição microbiana do que as outras bactérias presentes no leite.

Um outro dado relevante e que deve ser considerado é o teor de sal. No presente trabalho, a concentração de NaCl utilizada, na salga seca, foi de 0,6% para cada um dos

queijos. Quando MARTINIS et al. (1997) realizaram um experimento "in vitro" utilizando concentrações de 0,5% de NaCl e um pH de 5,5, afirmaram que foi impossível obter colônias de *Listeria monocytogenes* a 10°C, na presença de 100 UI de nisina / ml de ágar tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura e 0,5% de glucose (TSBYEG). Os dados obtidos por esses autores vem reforçar a idéia de que a nisina, cloreto de sódio, pH e temperatura, atuaram em conjunto para inibir a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* e de outros microrganismos presentes como *Staphylococcus aureus* e coliformes totais (Tabela 19 e 20) apesar, da concentração de nisina utilizada (26,4 UI/ml de leite) ter sido bem menor do que a aplicada por MARTINIS et al. (1997). Em experimentos utilizando placas em gradiente, THOMAS & WIMPENNY (1996), quando estudaram os efeitos da variação de temperatura, concentração de cloreto de sódio (NaCl) e nisina na inibição de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, afirmaram que a queda do pH de 7,92 para 5,0, aumentou a efetividade da nisina contra esses dois microrganismos patogênicos.

De acordo com ABDALLA et al. (1993), altas concentrações de sal (NaCl) durante a produção e estocagem de queijos macios, podem inibir outros microrganismos presentes, particularmente, bactérias ácido-láticas, com conseqüente diminuição da produção de ácido. No modelo descrito por COLE et al. (1990), para verificar o crescimento de *Listeria monocytogenes* em diferentes combinações de concentrações de sal e pH, foi concluído que as melhores concentrações de NaCl para o desenvolvimento desse microrganismo à 10°C, foram ao redor de 2,0 a 2,5%. Estas concentrações fornecem um efeito de proteção contra inativação de *Listeria monocytogenes*. Esses resultados vem de encontro aos de MARTINIS et al. (1997), onde concentrações de 2,0 a 3,5% de sal pareciam desempenhar um papel protetor, permitindo o crescimento e sobrevivência de colônias de *Listeria monocytogenes* na presença de nisina, à baixas temperaturas (10°C). Portanto, diante desses resultados, foi possível concluir que a concentração de 0,6% de NaCl utilizado em queijos não teve um efeito protetor sobre *Listeria monocytogenes* Scott A.

Um outro tema que deve ser ressaltado é que a aplicação da nisina, como único modo de controle de microrganismos em alimentos, pode resultar no aparecimento de mutantes de *Listeria monocytogenes* resistentes a essa bacteriocina. Diversos autores (HARRIS et al., 1991; MING & DAESCHEL, 1993; MARTINIS et al., 1997; MAZZOTTA et al., 1997; SCHILLINGER et al., 1998; CRANDALL & MONTVILLE, 1998) têm demonstrado com frequência a ocorrência de mutantes desse patógeno, resistentes à nisina, mesmo quando foram utilizadas concentrações de nisina tão altas quanto 10^4 UI/ml (MARTINIS et al., 1997). De acordo com SCHILLINGER et al. (1998) e MAZZOTTA et al. (1997) mesmo uma única exposição à nisina pode resultar em uma população emergente, resistente a essa bacteriocina. Portanto, é extremamente importante para o controle desse patógeno, a utilização de obstáculos adicionais, como foi demonstrado no presente trabalho. Dentre os obstáculos utilizados encontram-se o binômio temperatura/tempo aplicado no tratamento do leite (64,4°C/ 2,3 segundos), nisina (26,4 UI/ml de leite), refrigeração durante o armazenamento (7°C) e concentração de NaCl (0,6%) nos queijos processados. O pH final obtido nos queijos, certamente funcionou como um outro obstáculo adicional. De acordo com LOU & YOUSELF (1996) a teoria dos obstáculos estabelece que, a presença de dois ou mais fatores subletais (ou estresses) de preservação, aumentam a inibição de microrganismos aditivamente ou sinergicamente. Essa estratégia de preservação, através de vários obstáculos no controle de *Listeria monocytogenes* em alimentos, também foi enfatizada nos trabalhos de LEISTNER (1994), CHAWLA et al. (1996), MURIANA (1996), LOU & YOUSELF (1996), VILLANI et al. (1996), MARTINIS et al. (1997), MAZZOTTA et al. (1997) e SCHILLINGER et al. (1998). Segundo MURIANA (1996), as barreiras bioestáticas, simplesmente, inibem o crescimento dos microrganismos presentes enquanto que, as bacteriocinas podem servir como barreiras bactericidas e ajudam a reduzir os microrganismos susceptíveis em molhos para saladas refrigeradas.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

- A alta incidência (25%) de *Listeria monocytogenes* encontrada nas amostras de queijos Minas frescal indicaram que, se esse alimento fosse ingerido, poderia ter sido um veículo de risco à saúde pública. A fiscalização sobre tais alimentos deve ser mais rígida, tanto no produto final como, também, sobre as medidas de controle de *Listeria monocytogenes*, para assegurar que o anexo II da portaria 451/97 publicada pelo Diário Oficial da União seja cumprido.
- A grande frequência de *Listeria innocua* (40%) nos queijos Minas frescal estudados, poderia ser considerada como indício de contaminação por outras espécies desse mesmo gênero. A *Listeria innocua* quando detectada, deveria ser utilizada como microrganismo indicador de contaminação pré e pós-processo do alimento considerando que, com exceção de uma amostra de queijo, ela foi detectada nas demais amostras de queijos contaminados por outras espécies de *Listeria*.
- O ágar LPM e o ágar OXA, foram comparáveis quanto a sua eficiência no isolamento de *Listeria* spp.; enquanto que o ágar MOX, foi considerado mais eficiente, do que os outros meios seletivos, utilizados no isolamento desse microrganismo. Os meios ágar LPM, OXA e MOX, apesar de serem seletivos para *Listeria* spp., possibilitaram o crescimento de outros microrganismos, havendo necessidade da confirmação das colônias crescidas nesses meios de cultura.
- A metodologia de isolamento de espécies de *Listeria* proposta por WARBURTON et al. (1992), que inclui o duplo enriquecimento, deve ser adotada para alimentos que contém baixo número desse microrganismo e/ou que foram submetidos a algum tipo de tratamento no seu processamento.

- Os meios de cultura TSA-YE e TSAP-YE foram equivalentes na recuperação de células de *Listeria monocytogenes* Scott A não injuriadas e injuriadas pelo calor (56°C/20 minutos). O meio MOX, apesar de ser comparável aos demais na recuperação de células não injuriadas, é mais seletivo para as células injuriadas.
- O efeito da variável temperatura, na determinação da resistência térmica de *Listeria monocytogenes* Scott A, foi constatado em todos os tratamentos aplicados mas, principalmente, à temperaturas mais baixas (52 e 55°C), que apresentaram valores D muito altos, quando comparados aos valores encontrados em outras temperaturas estudadas.
- O binômio tempo/temperatura selecionado (64,4°C/2,3 segundos) para o processamento de leite, destinado à fabricação de queijos Minas frescal, foi eficiente para eliminar os coliformes fecais inicialmente presentes no leite. Porém, esse tratamento não foi efetivo para eliminar *Staphylococcus aureus* e coliformes totais. Também, não conseguiu eliminar *Listeria monocytogenes* (10⁵UFC/ml), propositalmente adicionada ao leite, para a fabricação dos queijos, causando apenas aproximadamente 2 reduções decimais. Em 21 dias de vida de prateleira a redução decimal foi ao redor de 3 ciclos logrítmicos.
- O tratamento termoquímico (64,4°C/2,3 segundos e 26,4UI de nisina/ml) aplicado ao leite utilizado para o processamento de queijos Minas frescal, foi efetivo durante os vinte e um dias de vida de prateleira (7°C) desse produto, no controle de microrganismos inicialmente presentes no leite, tais como *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e coliformes fecais. Esse tratamento, também foi eficiente para eliminar *Listeria monocytogenes* Scott A (10⁵ UFC/ml), intencionalmente inoculada no leite.
- No processamento dos queijos Minas frescal, o controle de *Listeria monocytogenes* Scott A e de outros microrganismos patogênicos presentes no leite foi conseguido devido à ação conjunta da nisina, em baixas concentrações e de obstáculos adicionais,

como temperatura aplicada e tempo curto de pasteurização (64,4°C/2,3 segundos), temperatura de refrigeração (7°C) durante o armazenamento e concentração de NaCl (0,6%).

- A relação entre o valor D, temperatura de pasteurização do leite e concentração de nisina adicionada é um polinômio de segunda ordem, que pode prever com exatidão, o decréscimo da resistência de *Listeria monocytogenes* Scott A, dentro do espaço experimental testado. A diminuição na resistência desse patógeno, foi obtida pelo efeito aditivo de nisina e calor utilizados no leite, para o preparo do queijo Minas frescal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDALLA, O. M.; DAVIDSON, P. M.; CHRISTEN, G.L. Survival of selected pathogenic bacteria in white pickled cheese made with lactic acid bacteria or antimicrobials. **Journal of Food Protection**, v.56, n.11, p.972-976, 1993.
2. ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, n.2, p.169-185, 1995.
3. AHAMAD, N.; MARTH, E. H. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35°C in triptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. **Journal of Food Protection**, v.52, n.10, p.688-95, 1989.
4. AL-GHAZALI, M. R.; AL-AZAWI, S. K. Effects of sewage treatment on the removal of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.65, n.3, p.203-208, 1988.
5. BAILEY, J. S.; FLETCHER, D. L.; COX, N. A. Efficacy of enrichment media for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.53, n.6, p.473-477, 1990.
6. BAIRD-PARKER, A. C.; DAVENPORT, E. The effect of recovery medium on the isolation of *Staphylococcus aureus* after heat treatment and after the storage of frozen or dried cells. **Journal of Applied Bacteriology**, v.28, p.390-402, 1965.
7. BALOGA, A. O. ; HARLANDER, S. K. Comparison of methods for determination between strains of *Listeria monocytogenes* from epidemiological surveys. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.8, p. 2324-2331, Ago., 1991.
8. BECKERS, H. J.; SOENTORO, P. S. S.; DELFGOU-VAN ASCH, E. H. M. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. **International Journal of Food Microbiology**, v.4, n.3, p.249-256, 1987.

9. BENKERROUM, N.; SANDINE, W. E. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Dairy Science**, v.71; n.12; p.3237-3245, 1988.
10. BILLE, J.; CATIMEL, B.; BANNERMAN, E.; JACQUET, C.; YERSIN, M.-N.; CANIAUX, I.; MONGET, D.; ROCOURT, J. API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.6, p.1857-1860,1992.
11. BOUSSOUEL, N.; MATHIEU, F.; BENOIT, V.; LINDER, M.; REVOL-JUNELLES, A. M.; MILLIERE, J. B. Response surface methodology, an approach to predict the effects of a lactoperoxidase system, nisin, alone or in combination, on *Listeria monocytogenes* in skim milk. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, n.4, p.642-652, 1999.
12. BRACKETT, R. E. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. **Food Technology**, v.42, n.4, p.162-164, 178, 1988.
13. BRADSHAW, J. G.; PEELER, J. J. CORWIN, J. J.; HUNT, J. M.; TWEDT, R. M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products. **Journal of Food Protection**, v.50, n.7, p.543-544, 1987.
14. BRADSHAW, J. G.; PEELER, J. T.; CORWIN, J. J.; HUNT, J. M.; TIERNEY, J. T.; LARKIN, E. P.; TWEDT, R. M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. **Journal of Food Protection**, v.48, n.9, p.743-745, 1985.
15. BRADSHAW, J. G.; PEELER, J. T.; TWEDT, R. M. Thermal resistance of *Listeria spp.* in milk. **Journal of Food Protection**, v.54, n.1 p.12-14, 1991.
16. BRASIL. Lei nº451, 19 set. 1997. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. **Diário Oficial**. Estado de São Paulo, 22 set.,1997, 20p.
17. BRASIL. Lei nº146, 7 mar. 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial**. Estado de São Paulo, 11 mar., 1996.

18. BRASIL. Ministério da Agricultura. LANARA. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes, Brasília D. F., 1981. v.2: Métodos físicos. e químicos
19. BREWER, D. G.; MARTIN, S. E.; ORDAL, Z. L. Beneficial effects of catalase on pyruvato in most-probable-number technique for the detection of *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.34, p.797-800, 1977.
20. BRUNO, M. E. C.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.7, p.2255-2259, 1992.
21. BUCHANAN, R. L.; KLAWITTER, L.A. Effects of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. **Journal of Food Science**, v.55, n.6, p.1754-1756, 1990.
22. BUCHANAN, R. L.; SMITH, J. L.; STAHL, H. G.; ARCHER, D. L. *Listeria*. Methods development research at the eastern regional research center. **Journal Association Official Analytical Chemistry**. v.71, n.3, p.651-654, 1988.
23. BUNNING, V. K.; CRAWFORD, R. G.; BRADSHAW, J.G.; PEELER, J.T.; TIERNEY, J.T.; TWEDT, R. M. Thermal resistance of intracellular *Listeria monocytogenes* cells suspended in raw bovine milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, n.6, p.1398-1402, 1986.
24. BUNNING, V. K.; DONNELLY, C. W.; PEELER, J. T.; BRIGGS, E. H.; BRADSHAW, J. G.; CRAWFORD, R.G.; BELEVEAU, C. M.; TIERNEY, J.T. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* within bovine milk phagocytes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.2, p.364-370, 1988.
25. BUSH, S. V.; DONNELLY, C. W. Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.1, p.14-20, Jan., 1992.

26. CAMPOS, A. C. **Efeito do uso combinado de ácido láctico com diferentes proporções de fermento láctico mesofílico no rendimento, proteólise, qualidade microbiológico e propriedades mecânicas do queijo Minas frescal**, 2000. 80p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
27. CANILLAC, N.; MOUREY, A. Sources of contamination by *Listeria* during the making of semi-soft surface ripened cheese. **Sciences Aliments**, v.13, n.3, p.533-544, 1993.
28. CANTONI, C.; CATALETA, R.; GIUSSANI, A.; RIPAMONTI, B. Isolamento de *Listeria* spp. per mezzo di terreni all'agar sangue. **Industrie Alimentari**, v.37, n.370, p.624-625, 1998.
29. CANTONI, C.; COMI, G.; VALENTI, M. Attualità su *Listeria monocytogenes* nei formaggi. **Industrie Alimentari**, v.27, n.258, p.266-268, 1988a.
30. CANTONI, C.; VALENTI, M.; COMI, G. *Listeria* in formaggi e in salumi. **Industrie Alimentari**, v.27, n.264, p.859-861 1988b.
31. CARMINATI, D. Patogeni emergenti. *Listeria monocytogenes* e prodotti lattiero-caseari. **Il Latte**, v.22, n.3, p.128-144, 1992.
32. CARNEIRO-DE-MELO, A. M. S.; COOK, G.M.; MILES, R. J.; POOLE, R. K. Nisin stimulates oxygen consumption by *Staphylococcus aureus*, e *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.5, p.1831-1834, May, 1996.
33. CARTER, J. L.; CHEN, C. L.; DENNIS, S. M. Serum levels of progesterone, estradiol and hydrocortisone in ewes after abortion due to *Listeria monocytogenes* type 5. **American Journal Veterinary Research**, v.37, n. ; p.1071-1073, 1976.
34. CARVALHO, J. UNICAMP. Departamento de Estatística. Comunicação pessoal, 1998.

35. CASADEI, M. A.; MATOS, R. E.; HARRISON, S. T.; GAZE, J. E. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products as affected by growth medium. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, n.2, p.234-239, 1998.
36. CASSAROTTI, V.T. **Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas frescal comercializados em Piracicaba.** Piracicaba, 1993. 109p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade São Paulo.
37. CHAWLA, C. S.; CHEN, H.; DONNELLY, C. W. Mathematically modelling the repair of heat-injured *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH, and salt concentration. **International Journal of Food Microbiology**, v.30, n.3, p.231-242, 1996.
38. COLE, M. B.; JONES, M. V.; HOLYOAK, C. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.69, n.1, p.63-72, 1990.
39. COMI, G.; CANTONI, C.; D'AUBERT, S. Indagine sulla presenza di *Listeria monocytogenes* nei formaggi. **Industrie Alimentari**, v.26, n.247, p.216-8, 1987.
40. CRANDALL, A. D.; MONTVILLE, T. J. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.1, p. 231-237, 1998.
41. DALLMIER, A. W.; MARTIN, S. E.. Catalase and superoxide dismutase activities after heat injury of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.2, p.581-582, 1988.
42. D'AOUST, J. Y. Recovery of sublethally heat-injured *Salmonella typhimurium* on supplemented plating media. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, p.483-486, 1978.

43. DAVIES, E. A.; BEVIS, H. E.; POTTER, R.; HARRIS, J.; WILLIAMS, G. C.; DELVES-BROUGHTON, J. Research note: the effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, n.3, p. 186-187, 1998.
44. DAVIES, E. A.; BEVIS, H.E.; DELVES-BROUGHTON, J. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, n.5, p.343-346, 1997.
45. DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its uses as a food preservative. **Food Technology**, v.44, n.11, p.100-112, 117, 1990b.
46. DELVES-BROUGHTON, J.; BLACKBURN, P.; EVANS, R.J.; HAGENHOLTZ, J. Applications of the bacteriocin, nisin. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.69, n.2, p.193-202, 1996.
47. DELVES-BROUGHTON, J. D. Nisin and its application as a food preservative. **Journal of Society of Dairy Technology**, v.43, n.3, p.73-76, 1990a.
48. DESTRO, M. T. **Isolamento de *Listeria spp.* e estudo de sua ocorrência em carne, leite e derivados**. Campinas, 1990, 73p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
49. DESTRO, M. T.; SERRANO, A.; KABUKI, D. Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v.2, n.2, p.110-112, 1991.
50. DEVER, F. P.; SCHAFFNER, D. W.; SLADE, P. J. Methods for detection of foodborne *Listeria monocytogenes* in the U.S. **Journal of Food Safety**, v.13, n.4, p.263-292, 1993.

51. DIJKSTRA, R. G. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in surface water of canals and lakes, in ditches of one big polder and in the effluents of canals of a sewage treatment plant. **Zentralblatt Bakteriologie Hygiene I. Abt. Originale B.**, v.176, p.202-205, 1982.
52. DILLON, R. M.; PATEL, T. R. *Listeria* in seafoods: a review. **Journal of Food Protection**, v.55, n. 12, p.1009-1015, Dec, 1992.
53. DOMINGUEZ, L.; GARAYZABAL, J. F. F.; VAZQUEZ, J. A.; BLANCO, J. L.; SUAREZ, G. Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of semi-hard cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v.4, n.6, p.125-127, 1987.
54. DONNELLY, C. W.; BRACKETT, R. E.; DOORES, S.; LEE, W. H.; LOVETT, J. *Listeria* In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. p.637-663.
55. DONNELLY, C. W.; BRIGGS, E. H.; DONNELLY, L. S. Comparison of heat resistance of *Listeria monocytogenes* in milk as determined by two methods. **Journal of Food Protection**, v.50, n.1, p.14-17, 1987.
56. DOYLE, M. P.; GLASS, K. A.; BEERY, J. T.; GARCIA, G. A.; POLLARD, D. J.; SCHULTZ, R. D. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.7, p.1433-1438, 1987.
57. DOYLE, M. P.; MESKE, L. M.; MARTH, E. H. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of nonfat dry milk. **Journal of Food Protection**, v.48, n.9, p.740-742, 1985.
58. DOYLE, M.P.; SCHOENI, J. L. Comparison of procedures for isolating *Listeria monocytogenes* in soft surface-ripened cheese. **Journal of Food Protection**, v.50, n.1, p.4-6, 1987.

59. EAPEN, K. C.; SANKARAN, R.; VIJAYARAGHAVAN, P. K. The present status on the use of nisin in processed foods. **Journal of Food Science and Technology**, v.20, n.5, p.231-240, 1983.
60. ECKNER, K. F. Bacteriocins and food applications. **Dairy Food and Environmental Sanitation** v.12, n.4, p.204-209, 1992.
61. EKLUND, M.W.; POYSKY, F. T.; PARAIPYE, R. N.; LASHBROOK, L. C.; PETERSON, M. E.; PEROY, G. A. Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold smoked fishery products and processing plants. **Journal of Food Protection**, v.58, n.5, p.502-508, 1995.
62. EL-MARRAKCHI, A.; HAMAMA, A.; EL OTHMANI, F. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in milk e dairy products produced or imported into Marocco. **Journal of Food Protection**, v.56, n.3, p.256-259, 1993.
63. EL-PRINCE, E. Isolation of *Listeria monocytogenes* and others *Listeria* species from milk and some dairy produts. **Assiut Veterinary Medical Journal**, v.40, n.80, p.168-176, 1999.
64. ERIESSON, H. A.; EKLON, M. L.; DANIELSON-THAM, S.; LOCARVIC, L. O.; MENTZING, I.; PERSSON, H.; UNNERSTAD; THAM, W. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. **Journal Clinical Microbiology**, v.35, p.2904-2907, 1997.
65. FAIRCHILD, T. M.; FOEGEDING, P. M. A proposed non pathogenic biological indicator for thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, p.1247-1250, 1993.
66. FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes* a foodborne pathogen. **Microbiological Reviews**, v.55, n.3, p.476-511, 1991.
67. FARBER, J. M.; COATES, F.; DALEY, E. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.15, p.103-105, 1992.

68. FARBER, J. M.; DALEY, E.; HOLLEY, R.; LISBORNE, W. R.. Survival of *Listeria monocytogenes* during the production of uncooked German, American and Italian-style fermented sausages. **Food Microbiology**, v.10, n. 2, p.123-132, 1993.
69. FARBER, J. M.; JOHNSTON, M. A.; PURVIS, U.; LOIT, A. Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria spp.* **International Journal of Food Microbiology**, v.5, n.2, p.157-163, 1987.
70. FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; SPEIRS, J. I.; DIAOUST, J. Y.; EMMONS, D. J.; McKELLAR, R. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.7, n.4, p.277-286, 1988.
71. FEDIO, W. M.; JACKSON, H. Effect of tempering on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.9, n.5, p.157-160, 1989.
72. FELON, D. R.; WILSON, J.; DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. **Journal of Applied Bacteriology**, v.81, n.6, p.641-650, 1996.
73. FENLON, D. R.; RYSER, E. T.; MARTH, E. H. *Listeria monocytogenes* in natural environment. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1999. p.21-37.
74. FERNANDEZ GARAYZABAL, J. F.; DOMINGUEZ RODRIGUES, L.; VASQUEZ BOLAND, J. A.; BLANCO CANCELLO, J. L.; SUAREZ FERNANDEZ, G. *Listeria monocytogenes* dans le lait pasteurisé. **Canadian Journal of Microbiology**, v.32, n.2, p.149-150, 1986.
75. FERREIRA, M. A. S. S.; LUND, B. M. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v.22, n.6, p.433-438, 1996.
76. FOWLER, G. G. The potential of nisin. **Food Manufacture**, v.54, n.2, p.57-59, 1979.

77. FURNANETTO, S. M. P.; SANTOS, M. A. A.; HARA, C. *Listeria* spp. Avaliação da eficiência de quatro meios de plaqueamento no seu isolamento. **Higiene Alimentar**, v.10, n.46, p.30-34, nov., 1996.
78. FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. São Paulo: Fonte de Comunicações e Editora Ltda, 1999, 176p.
79. GAO, F. H.; ABEE, T.; KONINGS, N. Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase-containing proteoliposomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.8, p. 2164-2170, 1991.
80. GARZAROLI, C.; RONDININI, G. Study on quantitative determination of *Listeria spp.* in dairy products. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v.25, p.158-161, 1992.
81. GAYA, P.; SANCHEZ, J.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* specie in raw milk produced in Spain. **Food Microbiology**, v.15, n.5, p. 551-555, 1998.
82. GENIGEORGIS, C.; TOLEDO, J. H.; GARAYZABAL, F. J. Selected microbiological and chemical characteristics of illegally produced and marketed soft hispanic-style cheeses in California. **Journal of Food Protection**, v.54, n.8, p.598-601, 1991.
83. GEORGE, A. E.; LEVETT, P. N. Effect of temperature and pH on survival of *Listeria monocytogenes* in coleslaw. **International Journal of Food Microbiology**, v.11, n.4, p.345-350, 1990.
84. GEORGE, S. M.; LUND, B. M. The effect of culture medium and aeration on growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. **Letters in Applied Microbiology**, v.15, n.2, p.49-52, 1992.
85. GEORGE, S. M.; LUND, B. M.; BROCKLEHURST, T. F. The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.6, n.5, p.153-156, 1988.

86. GEORGE, S.M.; RICHARDSON, L. C. C. ; PECK, M. W. Predictive models of the effect of temperature, pH and acetic and lactic acids on the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 32, n.12, p.73-90, Sept., 1996.
87. GILL, D. A. Circling disease of sheep in New Zealand. **Veterinarian Journal**, v.87, p.60-74, 1931.
88. GRAY, M. L. Listeriosis in fowls - A review. **Avian Diseases**, v.2, p.296- 314, 1958.
89. GRAY, M. L.; KILLINGER, A. H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. **Bacteriological Reviews**, v.30, n.2, p.309-382, 1966.
90. GREENWOOD, M. H.; ROBERTS, D.; BURDEN, P. The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy milk and dairy products: a national survey in England and Wales. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, n.2/3, p.197-206, 1991.
91. GUPTA, K. G.; SIDHU, R.; YADAV, N. K. Effect of monovalent and divalent ions upon the germination of *Bacillus* spores in the presence of nisin. **Journal of Food Science**, v.36, n.6, p.896-898, 1971.
92. HARRIS, L. J.; DAESCHEL, M. A.; STILES, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.52, n. , p.384-387,1989.
93. HARRIS, L. J.; FLEMING, H. P.; KLAENHAMMER, T. R. Developments in nisin research. **Food Research International**, v.25, n.1, p.57-66, 1992.
94. HARRIS, L. J.; FLEMING, H. P.; KLAENHAMMER, T. R. Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to nisin. **Journal of Food Protection**, v.54, n.11, p.836-840, 1991.
95. HARTMINK, R.; GEORGSSON, F. Incidence of *Listeria* species in seafood and seafood salads. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, n. 2/3, p.189-196, 1991.

96. HARVEY, J.; GILMOUR, A. Occurrence of *Listeria* species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, n.2, p.119-125, 1992.
97. HAYES, P. S.; FEELEY, J. S.; GRAVES, L. M.; AJELLO, G. W.; FLEMING, D.W. Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, n.2, p.438-440, 1986.
98. HAYES, P. S.; GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B.; AJELLO, W. G.; MALCOLM, G. B.; WEAVER, R. E.; RANSON, R.; DEEVER, K.; PLIKAYTIS, B. D.; SCHUCHAT, A.; WENGER, J. D.; PINNER, R. W.; BROOME, C. V.; *LISTERIA* STUDY GROUP. Comparison of three selective enrichment methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. **Journal of Food Protection**, v.55, n.12, p.952-959, Dec., 1992.
99. HEINEMANN, B.; STUMBO, C. R.; SCURLOCK, A. Use of nisin in preparing beverage quality sterile chocolate flavoured milk. **Journal of Dairy Science**, v.47, p.8, 1965.
100. HENNING, S.; METZ, R.; HAMMES, W. P. New aspects for the application of nisin to food products based on its mode of action. **International Journal of Food Microbiology**, v.3, n.3, p.135-141, 1986a.
101. HENNING, S.; METZ, R.; HAMMES, W. P. Studies on the mode of action of nisin. **International Journal of Food Microbiology**, v.3, n.3, p.121-134, 1986b.
102. HERNAN, L.; RIDDER, H. Comparison of different methods for detection of *Listeria monocytogenes* in dairy products. **Milchwissenschaft**, v.48, n.12, p.684-686, 1993.
103. HIRSCH, A.; GRINSTED, E.; CHAPMAN, H. R.; MATTICK, A. T. R. A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*. **Journal of Dairy Research**, v.18, p.205, 1951.

104. HITCHINS, A. D. *Listeria monocytogenes* In: Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**. 7ed. Washington DC., 1992, Chapt. 10, p.141-160.
105. HOF, H.; ROCOURT, J. Is any strain of *Listeria monocytogenes* detected in food a health risk? **International Journal of Food Microbiology**, v.16, n.3, p.173-182, 1992.
106. HOLLEY, R. A. Review of the potential hazard from botulism in cured meats. **Canadian Institute of Food Science Technology Journal**, v.14, n. 3, p.183-195, 1981.
107. HOLT, J. G.; KRIEG, N. K.; SNEATH, P. H. A.; WILLIAMS, S. T. *Listeria*. In: HOLT, J. G.; KRIEG, N. K.; SNEATH, P. H. A.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. p.566-567.
108. HUDSON, J. A. Efficacy of high sodium chloride concentration for the destruction of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.14, n.4, p.178-180, 1992.
109. HURST, A.. Interactions of food starter, cultures and food-borne pathogen: the antagonism between *Streptococcus lactis* and sporeforming microbes. **Journal of Milk Food Technology**, v.35, p.418-423, 1992.
110. HURST, A. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In: BRANEN, A. L.; DAVIDSON, P. M. **Antimicrobial in foods**. New York: Marcer Dekker, 1983. p.327-351.
111. HURST, A.; HENDRY, G. S.; HUGHES, A.; PALEY, B. Enumeration of sublethally heated staphylococci in some dried foods. **Canadian Journal of Microbiology**, v.22, p.667-683, 1976.
112. JAY, J. M. Food preservation with chemicals. In: JAY, J. M. **Modern food microbiology**. New York: AVI, 1992. Chapt.11, p.251-289.

113. JOHANSSON, T. Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and food-processing environments. **International Journal of Food Microbiology**, v.40, n.1-2, p.77-85, 1998.
114. JORGENSEN, F.; PANARETOU, B.; STEPHENS, P. J.; KNOCHELL, S. Effect of pre-and post-heat shock temperature on the persistence of thermotolerance and heat shock-induced proteins in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.80, p.216-224, 1996.
115. JUNEJA, V. K.; FOGLIA, T. A.; MARMER, B.S. Heat resistance and fatty acid composition of *Listeria monocytogenes*: effects of pH, acidulant and growth temperature. **Journal of Food Protection**, v.61, n.6, p.683-687, 1998.
116. JUNG, D-S.; BODYFELT, F. W.; DAESCHEL, M. A. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.2, p.387-393, 1992.
117. KACHAYANAND, N.; HANLIN-M.B.; RAY, B. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. **Letters in Applied Microbiology**, v.15, n.6, p.239-243, 1992.
118. KIM, W. J. Bacteriocins of lactic acid bacteria: their potentials as food biopreservative. **Food Reviews International**, v.9, n.2, p.299-313, 1993.
119. KINDERLERER, J. L.; MATTHIAS, H. E.; FINNER, P. Effect of medium-chain fatty acids in mould ripened cheese on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Dairy Research**, v.63, n. , p.593-606, 1996.
120. KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, v.70, p.337-349, 1988.
121. KLEIN, P. G.; JUNEJA, V. K. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.11, p.4441-4448, 1997.

122. KNABEL, S. J.; WALKER, H. W.; HARTMAN, P. A.; MENDONÇA, A. F. Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteurization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.2, p.370-376, 1990.
123. KNIGHT, K. P.; BARTLETT, F. M.; McKELLAR, R. C.; HARRIS, L. J. Nisin reduces the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A in liquid whole egg. **Journal of Food Protection**, v.62, n.9, p.999-1003, 1999.
124. LEE, W. H.; McCLAIN, D. Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, n.5, p.1215-1217, 1986
125. LEITNER, L. Futher development in the utilization of hurdle technology for food preservation. **Journal of Food Engineering**, v.22, n.1/4, 421-432, 1994.
126. LINTON, R. H.; PIERSON, M. D.; BISHOP, J. R. Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heat shock. **Journal of Food Protection**, v.53, n.11, p.924-927, 1990.
127. LIPINSKA, E.. Nisin and its application. In: **Antibiotics and antibiosis in agriculture**. Londres: M. Woodine, 1977. p.103.
128. LIU, W.; HANSEN, J. N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.8, p.2551-2558, Aug., 1990.
129. LONCAREVIC, S.; DANIELSSON-THAM, M.L.; THAM, W. Occurence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, n.2, p.245-250, July, 1995.
130. LOU, Y.; YOUSEF, A. E. Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. **Journal of Food Protection**, v.59, n.5, p.465-471, 1996.
131. LOVETT, J. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Champaign, v.42, n.4, p.172-175, Abr., 1988.

132. LOVETT, J.; FRANCIS, D. W.; HUNT, J. M. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. **Journal of Food Protection**, v.50, n.3, p.188-192, 1987.
133. LOVETT, J.; TWEDT, R. M. *Listeria*. **Food Technology**, v.42, n.4, p.188-191, 1988.
134. MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Microbial growth. In: MADIGAN, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. p.149-177.
135. MAHADEO, M.; TATINI, S. R. The potential use of nisin to control *Listeria monocytogenes* in poultry. **Letters in Applied Microbiology**, v.18, n.6, p.323-326, 1994.
136. MAISNIER-PATIN, S.; DESCHAMPS, N.; TATINI, S. R.; RICHARD, J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with producing starter. **Lait**, v.72, n. ,p.249-263, 1992.
137. MAISNIER-PATIN, S.; TATINI, S. R.; RICHARD, J. Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria monocytogenes* in milk. **Lait**, v.75, n. , p.81-91, 1995.
138. MARTH, E. H. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology** v.42, n.4, p.165-168, 1988.
139. MARTINIS, E. C. P.; CRANDALL, A. D.; MAZZOTA, A. S.; MONTVILLE, T. J. Influence of pH, salt, and temperature on nisin resistance in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.60, n.4, p.420-423, 1997.
140. MASSA, S.; CESARONI, D.; PODA, G.; TROVATELLI, L. D. The incidence of *Listeria spp.* in soft cheeses, butter and raw milk in the province of Bologna. **Journal of Applied Bacteriology**, v.68, n. 2, p.153-156, 1990.
141. MAZZOTTA, A. S.; CRANDALL, A. D.; MONTVILLE, T. J. Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.7, p.2654-2659, 1997.

142. Mc.KELLAR. Influence of ice cream mix components on the thermal stability of bovine milk gamma-glutamyl transpeptidase and *Listeria innocua*. **International of Dairy Journal**, v.6, n. ,p.1181-1189, 1996.
143. McCLURE, P. J.; KELLY, T. M.; ROBERTS, T. A. The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.14, n.1, p.77-92, 1991.
144. McCLURE, P. J.; ROBERTS, T. A.; OTTO OGURO, P. Comparison of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. **Letters in Applied Microbiology**, v.9, n.3, p.95-99, 1989.
145. McCLURE, P. J; BEAUMONT, A. L.; SUTHERLAND, J. P.; ROBERTS, T. A. Predictive modelling of growth of *Listeria monocytogenes*. The effects on growth of NaCl, pH, storage temperature and NaNO₂ **International Journal of Food Microbiology**, v.34, n.3, p.221-232, 1997.
146. MENENDEZ, S.; GODINEZ, M. R.; RODRIGUEZ-OTERO, J. L.; CENTENO, J. A. Removal of *Listeria* spp. in cheese factory. **Journal of Food Safety**, v.17, n.2, p.133-139, 1997.
147. MEYER, D. H.; DONNELLY, C. W. Effect of incubation temperature on repair of heat-injured *Listeria* in milk. **Journal of Food Protection**, v.55, n.8, p.579-582, 1992.
148. MILLER, A. J. Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Food Protection**, v.55, n.6, p.414-418, 1992.
149. MILLER, A. J.; WHITING, R. C.; SMITH, J. L. Use of risk assessment to reduce listeriosis incidence. **Food Technology**, v.51, n.4, p.100-103, 1997.
150. MING, X.; DAESCHEL, M. A. Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance response of *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Food Protection**, v.56, n.11, p.944-948, 1993.

151. MOHALLEM, M. L. **Utilização da nisina na destruição térmica de *Bacillus stearothermophilus* em homogeneizado de cogumelos pH 6,2.** Campinas, 1994.113p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
152. MORRIS, S. L.; WALSH, R. C.; HANSEN, J. N. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. **Journal of Biological Chemistry**, v.259, p.13590-13594, 1984.
153. MOURA, S. M. **Incidência de *Listeria spp.* em amostras de leite cru e pasteurizado, tipos C e B, obtidas em uma usina de beneficiamento da cidade de São Paulo.** São Paulo, 1992. 104p. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
154. MURIANA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria spp.* in food. **Journal of Food Protection**, supplement, p.54-63, 1996.
155. NAGI, M. S.; VERNA, J. D. An outbreak of listeriosis in chicken. **Industrial Journal of Veterinary Medicine**, v.44, p.533-543, 1967.
156. NIEDERHANSER, C.; CANDRIAN, V.; HOFELEIN, C.; JERMINI, M.; BUHLER, H.P.; LUTHY, J. Use of polimerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.5, p.1564-1568, 1992.
157. NIEDERHAUSER, C.; HOFELEIN, C.; LUTHY, J.; KAUFMANN, U.; BUHLER, H. P.; CANDRIAN, U. Comparison of "gen-probe" DNA probe and PCR for detection of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated soft cheese and semi-soft cheese. **Research in Microbiology**, v.144, p.47-54, 1993.
158. NOLAN, D. A.; CHAMBLIN, D. C; TROLLER, J. A. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **International Journal of Food Microbiology**, v.16, n.4, p.323-335, 1992.

159. O'BRIEN, R. T.; TITUS, D. A.; DELULIN, K. A.; STUMBO, C. R.; LEWIS, J. C. Antibiotics in food preservation II- Studies on the influence of subtilin and nisin on the thermal resistance of food spoilage. **Food Technology**, v.10, p.352-355, 1956.
160. OLIVEIRA, A. N.; MESQUITA, A. J.; NUNES, I. A.; SILVA, T. J. P.; LAGE, M. E.; OLIVEIRA, A. N.; MESQUITA, A. J.; SILVA, T. J. P. Ocorrência de bactérias do gênero *Listeria* em leite cru e pasteurizado em Goiânia, Goiás. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.5, n.2, p.55-58, 1998.
161. PAGÁN, R.; CONDÓN, S.; SALA, F. J. Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.8, p.3225-3232, Aug., 1997.
162. PARISH, M. E.; HIGGINS, D. P. Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. **Journal of Food Protection**, v.52, n.3, p.144-147, Mar., 1989.
163. PINI, P. N.; GILBERT, R. J. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v.6, n.4, p.317-326, 1988.
164. PYASENA, P.; LIOU, S.; McKELLAR, R. C. Predictive modelling of inactivation of *Listeria* spp. in bovine during high-temperature short-time pasteurization. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, n.3, p.167-173, Feb., 1998.
165. QUINTAVALLA, S.; CAMPANINI, M. Effect in rising temperature on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat emulsion. **Letters in Applied Microbiology**, v.12, n.5, p.184-187, 1991.
166. RADLER, F. Possible use of nisin in winemaking II. Experiments to control lactic acid bacteria in the production of wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.41, n.1, p.7-11, 1990.
167. RAMSEIER, H. R. The action of nisin on *Clostridium butyricum*. **Archives Mikrobiologie**, v.37, p.57-94, 1960.

168. RAYMAN, M. K.; ARIS, B.; HURST, A. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, n.2, p.375-380, 1981.
169. RAZAVILAR, V.; GENIGEORGIS, C. Prediction of *Listeria* spp. growth as affected by various levels of chemicals, pH, temperature and storage time in a model broth. **International Journal of Food Microbiology**, v.40, n.3, p.149-157, Apr., 1998.
170. REA, M.; COGAN, T. M.; TOBIN, S. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. **Journal of Applied Bacteriology**, v.73, n.4, p.331-336, 1992.
171. REBHUM, W. C.; DELAHUNTA, A. Diagnosis and treatment of bovine listeriosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.180, p.395-398, 1982.
172. ROBERTS, D. *Listeria monocytogenes* in food. The U.K. approach dair. **Food and Environmental Sanitation**, v.14, n.4, p.198, 200, 202-204, 1994.
173. ROBERTS, R. F.; ZOTTOLA, E. A. Shelf life of pasteurized process cheese spreads made from cheese manufactured with a nisin-producing starter culture. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.7, p.1829-1836, 1993.
174. ROBERTS, R. F.; ZOTTOLA, E. A.; MCKAY, L. L. Use of nisin-producing starter culture suitable for Cheddar cheese manufacture. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.9, p.2353-2363, 1992.
175. ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes*: the state of the science. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.14, n.2, p.70-82, Feb., 1994.
176. RODRIGUEZ, E.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw milk Manchego cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, n.1/ 2, p. 129-132, Jan.,1998.
177. ROGERS, L. A. The inhibitory effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Bacteriology**, v.16, n. ,p.321-325,1928.

178. RORVICK, L. M.; YNDESTAD, M. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, v.13, n.2, p.97-104, 1991.
179. ROSENOW, E. M.; MARTH, E. H. Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21 and 35°C. **Journal of Food Protection**, v.50, n.6, p.452-459, 1987.
180. ROSSEN, L.; HOLMSTROM, K.; OLSEN, J. E.; RASMUSSEN, O. F. A rapid polymerase chain reaction (PCR) - based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. **International Journal of Food Microbiology**, v.14, n.145-152, 1991.
181. ROWAN, N. J.; ANDERSON, J. G. Effects of above-optimum growth temperature and cell morphology on thermotolerance of *Listeria monocytogenes* cells suspended in bovine milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.6, p.2065-2071, Jun., 1998.
182. RUHR, E.; SAHL, H.-G. Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.27, n.5, p.841-845, Aug., 1985.
183. RYSER, E. T.; MARTH, E. H. Occurrence and survival of *Listeria monocytogenes* in nature environments. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.22-32.
184. RYSER, E. T.; MARTH, E. H. Behavior of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of brick cheese. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.4, p.838-853, 1989.
185. RYSER, E. T.; MARTH, E. H. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis, and food safety**, New York: Marcel Dekker, 1991. p.120-193.

186. RYSER, E. T.; MARTH, E. H. Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of Camembert cheese. **Journal of Food Protection**, v.50, p.372-378, 1987b.
187. RYSER, E. T.; MARTH, E. H. *Listeria monocytogenes*: characteristics and classification. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.1-21.
188. RYSER, E. T.; MARTH, E. H. Listeriosis in animals. In: RYSER, E.T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.33-44.
189. RYSER, E. T.; MARTH, E. H. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. **Journal of Food Protection**, v.50, n.1, p.7-13, 1987a.
190. RYSER, E. T.; MARTH, E. H.; DOYLE, M. P. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and store of cottage cheese. **Journal of Food Protection**, v.48, n.9, p.746-750, 1985.
191. RYSER, E. T.; MARTH, E.H. Listeriosis in humans. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.45-65.
192. SCHILLINGER, U.; CHUNG, H.-S.; KEPPLER, K.; HOLZAPFEL, W. H. Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, n.4, p.657-663, 1998.
193. SCHOTHORST, M. V. Sampling plans for *Listeria*. **Food Control**, v.7, n.4/5, p.203-208, 1996.
194. SCHWARTZ, B.; HEXTER, D.; BROOME, C. V. Investigation of an outbreak of listeriosis: new hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v.159, n.4, p.680-685, 1989.
195. SCOTT, N. S.; TAYLOR, S. L. Temperature, pH, and spore load effects on the ability of nisin to prevent the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. **Journal of Food Science**, v.46, n.1, p.121-126, 1981.

196. SCOTT, V. N.; TAYLOR, S. L. Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. **Journal of Food Science**, v.46, n.1, p.117-120,126, 1981a.
197. SEELINGER, H. P. R.; JONES, D. Genus *Listeria* Pirie 1940, 383^{AL} In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9 ed., Baltimore:Willians & Wilkins, 1986. v.2, p.1235-1245.
198. SERAFINI, A. B.; CAIXETA, E. R.; BARBOSA, A. J.; VIEIRA, J. D. G. Isolation of *Listeria* spp. from waste water samples from 4 dairy factories in towns of Goiania and Anapoles, Goiás (Brazil). **Higiene Alimentar**, v.10, n.46, p.48-50, 1996.
199. SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v.61, n.3, p.354-356, 1998.
200. SILVA, M. C. D.; VILARDI, T. C. C.; TIBANA; A. Evaluation of methods for detection of *Listeria* from Brazilian cheese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.2, p.150-155, 1998.
201. SKOVGAARD, N.; MORGEN, C. A. Detection of *Listeria spp.* in faeces from animals, in feeds and raw food of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.6, n.3, p.229-242, 1988.
202. SKOVGAARD, N.; NORRUNG, B. The incidence of *Listeria spp.* in faeces of Danish pigs and minced pork meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.8, n.1, p.59-63, 1989.
203. SLADE, P. J.; COLLINS-THOMPSON, D. L. Two-stage enrichment procedures for isolating *Listeria monocytogenes* from raw milk. **Journal of Food Protection**, v.50, n.11, p.904-908, 1987.
204. SMITH, J. L.. Stress-induced injury in *Listeria monocytogenes*. In: MILLER, A.J.; SMITH, J.L.; SOMKUTI, G.A. **Society for industrial microbiology**. 1990, p.203-209.

205. SMITH, J. L.; ARCHER, D. L. Heat-induced injury in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, n.2, p.105-110, 1988.
206. SNEATH, P. H. A.; JONES, D. Genus *Brochothrix* Sneath and Jones 1976, 102^{AL}.
In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9 ed., Baltimore: Willians & Wilkins, 1986. v.2, p.1249-1253.
207. SOMMERS, E. B.; TAYLOR, S. L. Antibotulinal effectiveness of nisin in pasteurized process cheese spreads. **Journal of Food Protection**, v.50, n.10, p.842-848, 1987.
208. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, S.A.S.. Users guide; statistic. 8 ed. , Cary, 1998. 956p.
209. STEVENS, K. A.; SHELDON, B. W.; KLAPES, N. A.; KLAENHAMMER, T. R. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of Gram-negative bacteria. **Journal of Food Protection**, v.55, n.10, p.763-766, 1992.
210. SUÁREZ-FERNANDEZ, G.; SUÁREZ RODRIGUES, M.; FERNÁNDEZ GARAYZABAL, F.; DOMÍNGUEZ RODRIGUEZ, L. Termoresistencia de *Listeria monocytogenes*. **Alimentaria**, v.26, n.200, p.51-53, 1989.
211. SZABO, E. A.; CAHILL, M. E. The combined effects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTATM 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, n.1/2, p.21-31, Aug., 1998.
212. TAPIA DE DAZA, M. S.; VILLEGAS, Y.; MARTINEZ, A. Minimal water activity for growth of *Listeria monocytogenes* as affected by solute and temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v.14, n.3/4, p.333-337, 1991.
213. TAYLOR, L.Y.; CANN, D. D.; WELCH, B. Antibotulinal properties of nisin fresh fish packaged in an atmosphere of carbon dioxide. **Journal of Food Protection**, v.53, n.11, p.953-957, 1990.
214. TAYLOR, S. L.; SOMERS, E. B. Evaluation of the antibotulinal effectiveness of nisin in Bacon. **Journal of Food Science**, v.48, n.11, p.949-952, 1985.

215. THOMAS, L. V.; WIMPENNY, J-D W. T. Investigation of the effects of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.6, p.2006-2012, 1996.
216. UKUKU, D. O.; SHELEF, L. A. Sensitivity of six strains of *Listeria monocytogenes* to nisin. **Journal of Food Protection**, v.60, n.7, p.867-869, 1997.
217. URARTE, E.; FERNANDEZ, J. C.; MOLINERO, M. E. Microbiological quality of fresh cheeses marketed in the Basque Autonomous Region. **Alimentaria**, v.36, n.299, p.37-40, 1999.
218. URL, B.; HEITZER, A; BRANDL, E. Determination of *Listeria* in dairy and environmental samples: comparasion of a cultural method and a colorimetric nucleic acid hybridization assay. **Journal of Food Protection**, v.56, n.7, p.581-592, 1993.
219. VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.
220. VILLANI, F.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; MOSCHETTI, G.; SANNINO, L.; COPPOLA, S. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the traditional manufacture of water-buffalo Mozzarella cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v.22, n.5, p.357-360, 1996.
221. VLAEMYNCK, G. M.; MOERMANS, R. Comparison of EB and Frasier Enrichment Broth for the detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in raw-milk dairy products and environmental samples. **Journal of Food Protection**, v.59, n.11, p.1172-1175, 1996.
222. WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSON, THAM, M. L. Comparison of the ISO and IDF methods for detection of *Listeria monocytogenes* in blue veined cheese. **International Dairy Journal**, v.49, n.2, p.149-155, 1999.

223. WAITE, B. L.; HUTKINS, R. W. Bacteriocins inhibit glucose PEP:PTS activity in *Listeria monocytogenes* by induced efflux of intracellular metabolites. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, n.2, p.287-292, 1998.
224. WAITE, B. L.; SIRAGUSA, G. R.; HUTKINS, R.W. Bacteriocin inhibition of two glucose transport system in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, n.5, p.715-721, 1998.
225. WALSH, D.; DUFFY, G.; SHENDAN, J. J.; BLAIR-IS; McDOWELL, D. A. Comparison of selective and nonselective enrichment media for the isolation of *Listeria* species from retail foods. **Journal of Food Safety**, v.18, n.2, p.85-99, 1998.
226. WARBURTON, D. W.; FARBER, J. M.; POWELL, C.; TIWARI, N. P.; READ, S.; PLANTE, R.; BABIUK, T.; LAFFEY, P.; KAURI, T.; MAYERS, P.; CHAMPAGNE, M.-J.; HUNT, T.; LACASSE, P.; VIET, K.; SMANDO, R.; COATES, F. Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v.9, n.2, p.127-145, 1992.
227. WARBURTON, D. W.; FARBER, J.M.; ARMSTRONG, A.; CALDEIRA, R.; TIWARIN, P.; BABIUK, T.; LACASSE, P.; READ, S. A. Canadian Comparative study of modified versions of the "FDA and USDA" methods for the detection of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.54, n.9, p.669-676, 1991.
228. WATKINS, J.; SLEATH, K. P. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. **Journal of Applied Bacteriology**, v.50, n.1, p.1-9, 1981.
229. WEHR, H. M. *Listeria monocytogenes*-a current dilemma. **Journal Official Analytical Chemistry**, v.70, n.5, p.769-772, 1987.
230. WEIS, J.; SEELIGER, H. P. R. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. **Applied Microbiology**, v.30, n.1, p.29-32, 1975.
231. WELSHIMER, H. J.; DONKER-VOET, J. *Listeria monocytogenes* in nature. **Applied Microbiology**, v.21, n.3, p.516-519, 1971.

232. WENGER, J.; SWAMINATHAN, B.; HAYES, P. S.; GREEN, S. S.; PRATT, M.; PINNER, R. W.; SCHUCHAT, A.; BROOME, C. V. *Listeria monocytogenes* contamination of turkey franks: evaluation of a production facility. **Journal of Food Protection**, v.53, n.12, p.1015-1019, Dec., 1990.
233. WHITING, R. C. Modeling bacterial survival in unfavorable environments. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, n.3/5, p.240-246, 1993.
234. WIECKOWSKA, M.; SADOWSKA, B.; BRZYCHEY, M.; DRUDNICKA, W., ROZALSKA, B. The isolation and detection of *Listeria* from artificially contaminated food by use of immunomagnetic separation and cultivation procedure. **Polish-Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.8, n.1, p.37-43, 1999.
235. WINKOWSKI, K.; BRUNO, M. E.; MONTVILLE, T. J. Correlation of bioenergetic parameters with cell death in *Listeria monocytogenes* cells exposed to nisin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.11, p.4186-4188, 1994.
236. WIRJANTORO, T. I.; LEWIS, M. J. Effect of nisin and high temperature pasteurization on the shelf life of whole milk. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, n.4, p.99-102, 1996.
237. YU, L. S. L.; FUNG, D. Y. C. Comparisons of selected methods with the Fung-Yu tube procedure for determining *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meats. **Journal of Food Protection**, v.55, n.5, p.349-355, 1992.
238. ZAPICO, P.; MEDINA, M.; GAYA, P.; NUNEZ, M. Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.40, n.1/2, p.35-42, Mar., 1998.
239. ZOTTOLA, E. A.; YEZZI, T. L.; AJAO, D. B.; ROBERTS, R. F. Utilization of Cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agents in other foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.24, n.1/2, p.227-238, 1994.

APÊNDICE 1

Dados de termorresistência de *Listeria monocytogenes* Scott A sob ação do calor e tratamentos combinados calor-nisina.

Substratos	Inóculo UFC/ml	Pré- tratamento	Nisina UI/ml	Valor D (seg.)	Valor Z	Referências
Meio TSB	10^8	nenhum	zero	$D_{52^\circ\text{C}} = 594,6$ $D_{56^\circ\text{C}} = 132,7$ $D_{60^\circ\text{C}} = 22,6$ $D_{64^\circ\text{C}} = 9,1$ $D_{68^\circ\text{C}} = 4,0$	7,27	CASADEI et al.(1998)
Leite desnatado	2×10^6 2×10^6	nenhum nenhum	25 50	$D_{60^\circ\text{C}} = 40,2$ $D_{60^\circ\text{C}} = 33,3$		MAISNIER- PATIN et al.(1995)
Leite cru	1×10^5	nenhum	zero	$D_{52,2^\circ\text{C}} = \text{----}$ $D_{57,8^\circ\text{C}} = 330$ $D_{63,3^\circ\text{C}} = 31$ $D_{68,9^\circ\text{C}} = 4$ $D_{71,7^\circ\text{C}} = 2$	6,2	BRADSHAW et al. (1991)
Leite estéril	1×10^5	nenhum	zero	$D_{52,2^\circ\text{C}} = 1704,8$ $D_{57,8^\circ\text{C}} = 290,2$ $D_{63,3^\circ\text{C}} = 50,6$ $D_{68,9^\circ\text{C}} = 7,3$ $D_{71,7^\circ\text{C}} = \text{----}$	7,0	BRADSHAW et al. (1991)
Meio TSB- YE		48°C/10min.	zero	$D_{50^\circ\text{C}} = 5814$ $D_{55^\circ\text{C}} = 1200$ $D_{60^\circ\text{C}} = 199,2$ $D_{65,8^\circ\text{C}} = 32,4$		LINTON et al. (1990)

Continuação:

Substratos	Inóculo UFC/ml	Pré- tratamento	Nisina UI/ml	Valor D (seg.)	Valor Z	Referências
Meio TSB- YE	3x10 ⁸	48°C/1 hora	zero	D _{60°C} = 984		FEDIO & JACKSON(1989)*
Leite UHT	3x10 ⁸	nenhum	zero	D _{60°C} = 180		
	3x10 ⁸	48°C/1 hora	zero	D _{60°C} = 984		FEDIO & JACKSON(1989)
	3x10 ⁸	nenhum	zero	D _{60°C} = 264		
Leite desnatado estéril	10 ⁵	nenhum	zero	D _{52,2°C} = 1711,5 D _{57,8°C} = 245,8 D _{63,3°C} = 25,9 D _{66,1°C} = 12,0 D _{68,9°C} = 4,4 D _{71,7°C} = ----	6,5	BRADSHAW et al. (1987)
Leite integral estéril	10 ⁵	nenhum	zero	D _{52,2°C} = 1445,0 D _{57,8°C} = 255,6 D _{63,3°C} = 34,9 D _{66,1°C} = 9,9 D _{68,1°C} = 3,2 D _{71,7°C} = 2,0	6,5	BRADSHAW et al. (1987)
Leite cru	10 ⁵	nenhum	zero	D _{52,2°C} = 1683,7 D _{57,8°C} = 289,6 D _{63,3°C} = 19,9 D _{66,1°C} = 7,3 D _{68,9°C} = 3,0 D _{71,7°C} = 0,9 D _{74,4°C} = 0,7	6,3	BRADSHAW et al. (1985)

APÊNDICE 2

Dados da curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* Scott A em TSB-YE

Tempo(min)	UFC/ml	Log(N)	Tempo(min.)	UFC/ml	Log(N)
0	2,15E+05	5,33243846	630	2,35E+09	9,371067862
30	2,40E+05	5,380211242	660	2,36E+09	9,372912003
60	2,40E+05	5,380211242	690	2,80E+09	9,447158031
90	4,80E+05	5,681241237	720	3,75E+09	9,574031268
120	7,00E+05	5,84509804	750	2,80E+09	9,447158031
150	1,15E+06	6,06069784	780	2,80E+09	9,447158031
180	1,85E+06	6,267171728	810	2,65E+09	9,423245874
210	1,95E+06	6,290034611	840	2,17E+09	9,335457901
240	4,60E+06	6,662757832	870	1,90E+09	9,278753601
270	7,20E+06	6,857332496			
300	1,87E+07	7,271841607			
330	2,73E+07	7,435366507			
360	4,95E+07	7,694605199			
390	6,35E+07	7,802773725			
420	1,29E+08	8,108903128			
450	1,30E+08	8,113943352			
480	3,45E+08	8,537819095			
510	7,30E+08	8,86332286			
540	1,37E+09	9,135132651			
570	1,83E+09	9,26245109			
600	1,97E+09	9,293362555			

R2(dois pontos) = 0,99

m(intervalo) = 0,007

m(dois pontos - t=90 e t=510) = 0,007

APÊNDICE 2 (Continuação)

Estatística da Regressão da Curva de crescimento

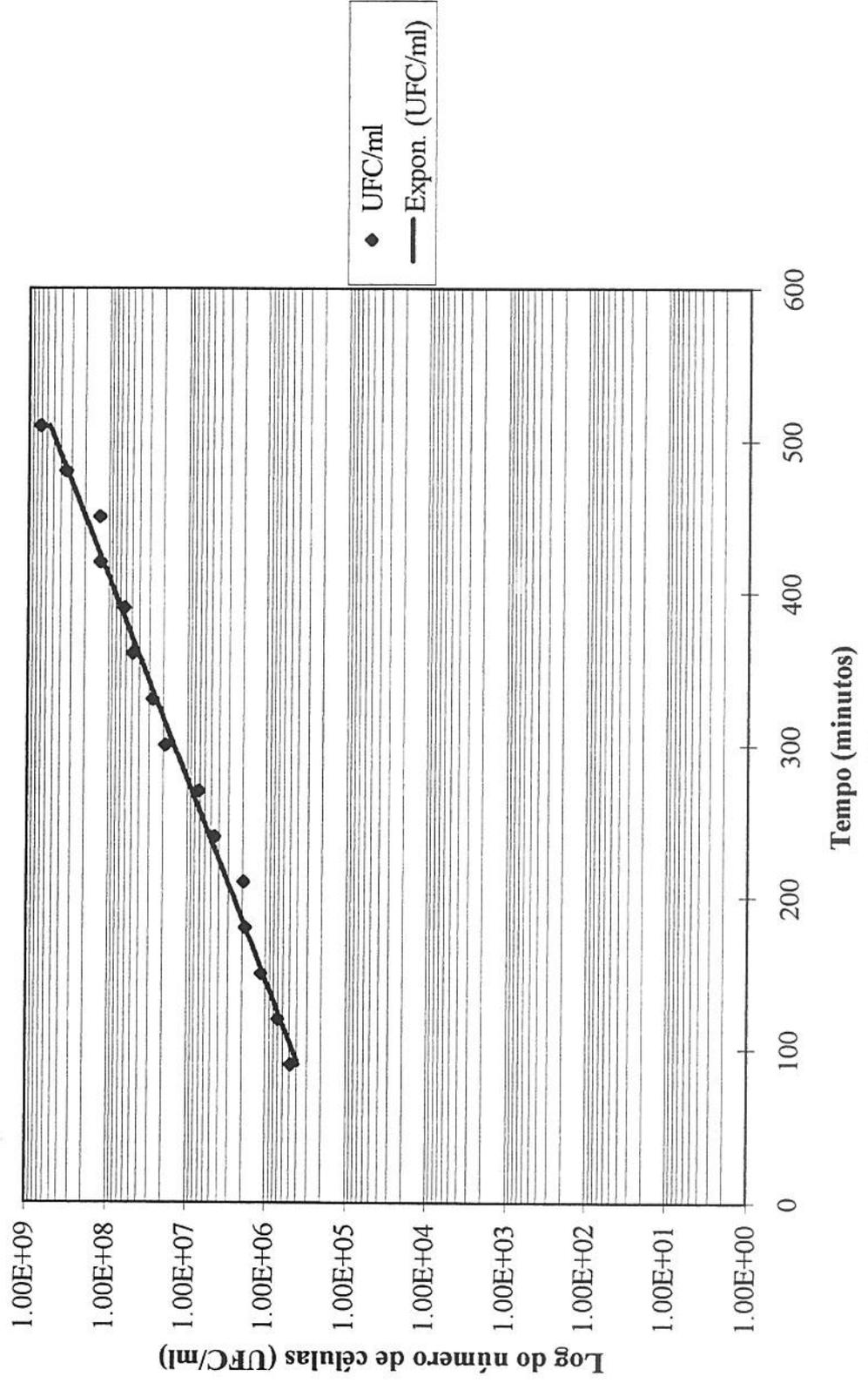
Estatística de regressão	
R múltiplo	0,995521
R-Quadrado	0,991062
R-quadrado ajustado	0,990375
Erro padrão	0,099548
Observações	15

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	14,28501	14,28501	1441,497	1,05E-14
Resíduo	13	0,128828	0,00991		
Total	14	14,41384			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95.000%	Superior 95.000%
Interseção	4,90748	0,064807	75,72508	1,38E-18	4,767474	5,047486	4,767474	5,047486
Variável X 1	0,007529	0,000198	37,96705	1,05E-14	0,007101	0,007957	0,007101	0,007957

APÊNDICE 2 (Continuação)

Fase exponencial da curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* Scott A em TSB-YE



APÊNDICE 3

Análise estatística do ajuste da superfície quadrática e sua análise canônica.

Superfície de resposta para a variável RESPOSTA=Valor D

Response Mean	36.629671
Root MSE	5.423091
R-Square	0.9739
Coef. of Variation	14.8052

Regression	Degrees of Freedom	Type I Sum of Squares	R-Square	F-Ratio	Prob > F
Linear	2	6212.791510	0.7867	105.6	0.0000
Quadratic	2	556.161649	0.0704	9.455	0.0102
Crossproduct	1	922.911858	0.1169	31.381	0.0008
Total Regress	5	7691.865017	0.9739	52.308	0.0000

APÊNDICE 3 (Continuação)

Parameter	Degrees of Freedom	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T	Parameter Estimate from coded data
INTERCEPT	1	5590.743011	1990.131985	2.809	0.0262	2.672816
CONC	1	-17.857553	2.767353	6.453	0.0003	-13.739250
TEMP	1	-162.102213	62.790037	-2.582	0.0364	-21.338792
CONC*CONC	1	0.028926	0.006860	4.217	0.0040	18.078821
TEMP*CONC	1	0.247839	0.044242	5.602	0.0008	24.783871
TEMP*TEMP	1	1.176340	0.494238	2.380	0.0489	18.821443

Factor	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob > F
CONC	3	3492.831583	1164.277194	39.588	0.0001
TEMP	3	5473.127206	1824.375735	62.033	0.0000

APÊNDICE 3

(Continuação)

Canonical Analysis of Response Surface (based on coded data)

Factor	Critical Value
	Coded Uncoded
CONC	-0.015630 24.609259
TEMP	0.577165 66.308660

Predicted value at stationary point -3.377815

Eigenvalues	Eigenvectors	
	CONC	TEMP
30.847629	0.696437	0.717618
6.052635	0.717618	-0.696437

Stationary point is a minimum

APÊNDICE 4

Análise estatística do tratamento número 1 do plano experimental. Temperatura=68°C e Nisina=25UI/ml

Tempo	Contagem	Log(N)
0	5,30E+08	8,72427587
0,2	1,00E+07	7
0,4	6,00E+05	5,77815125
1	1,40E+02	2,14612804

RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9973489
R-Quadrado	0,99470484
R-quadrado ajustado	0,99205726
Erro padrão	0,24833119
Observações	4

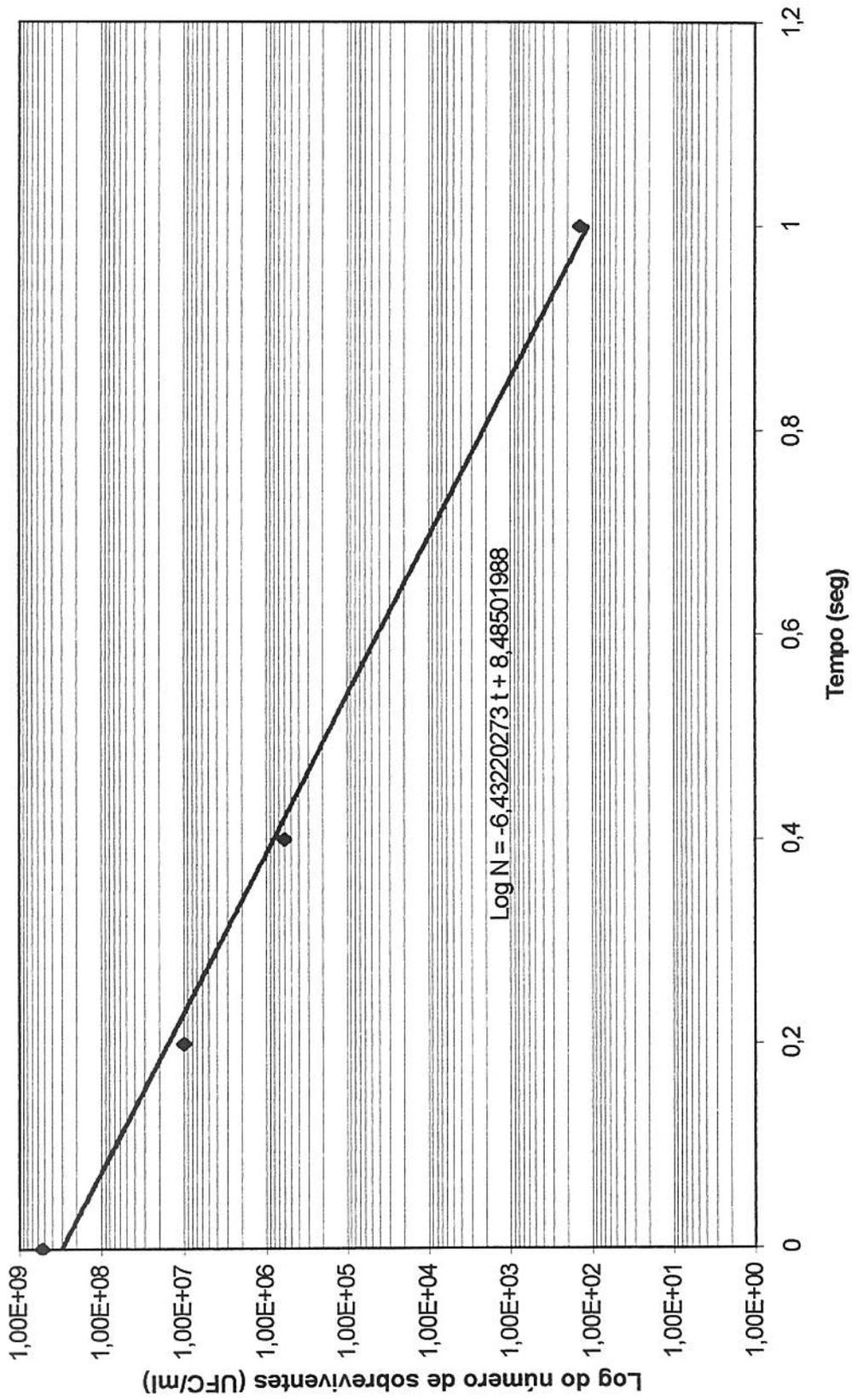
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	23,1690099	23,1690099	375,703229	0,0026511
Resíduo	2	0,12333676	0,06166838		
Total	3	23,2923466			

Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P		Superior 95.0%	
			inferiores	superiores	Inferior	Superior
Interseção	8,48501988	0,18175982	46,6825936	0,00045855	7,70296994	9,26706982
Variável X 1	-6,43220273	0,33184651	-19,3830655	0,0026511	-7,86002403	-5,00438142
D (seg)=	0,15546774				0,12722607	0,1998249

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à 68C/25UI de nisina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise experimental do tratamento número 2 do plano experimental. Temperatura=66°C e Nisina=7,3UI/ml

Tempo	Contagem	Log(N)
0	4,97E+08	8,69635639
6	2,65E+07	7,42324587
10	4,50E+06	6,65321251
12	3,67E+06	6,56466606
13	2,50E+06	6,39794001
16	5,52E+05	5,74193908
30	6,75E+03	3,82930377

RESUMO DOS RESULTADOS

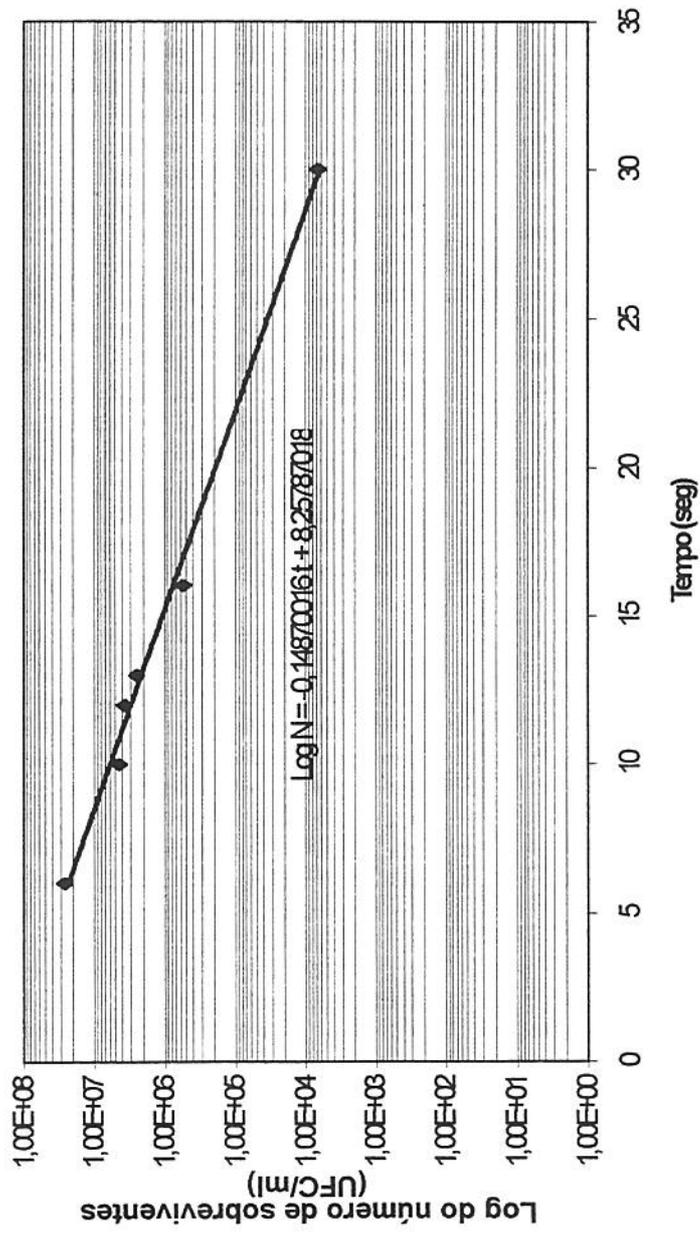
Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99668714
R-Quadrado	0,99338525
R-quadrado ajustado	0,99173156
Erro padrão	0,11244569
Observações	6

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	7,59538167	7,59538167	600,708779	1,6444E-05
Resíduo	4	0,05057613	0,01264403		
Total	5	7,6459578			

Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P		Superior 95.0%	
			95% inferiores	95% superiores	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Interseção	8,25787018	0,09922962	83,2198094	1,2498E-07	7,98236401	8,53337635
Variável X 1	-0,14870016	0,00606708	-24,509361	1,6444E-05	-0,1655451	-0,13185522
D(seg)=	6,72494241			6,04065007	7,58407595	

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à temperatura de 66°C/7,3U de nisina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise estatística do tratamento número 3 do plano experimental. Temperatura=66°C e Nisina=42,7UI/ml

Tempo(seg)	Contagem	Log(N)
0	5,25E+08	8,7201593
1	7,67E+07	7,88479536
3	3,45E+07	7,5378191
5	1,35E+07	7,13033377
7	3,27E+05	5,51454775
9	1,29E+05	5,11058971
11	5,82E+04	4,76492298
13	1,85E+04	4,26717173
15	7,25E+03	3,86033801

Sem utilizar os pontos zero,1, 3,5

RESUMO DOS RESULTADOS

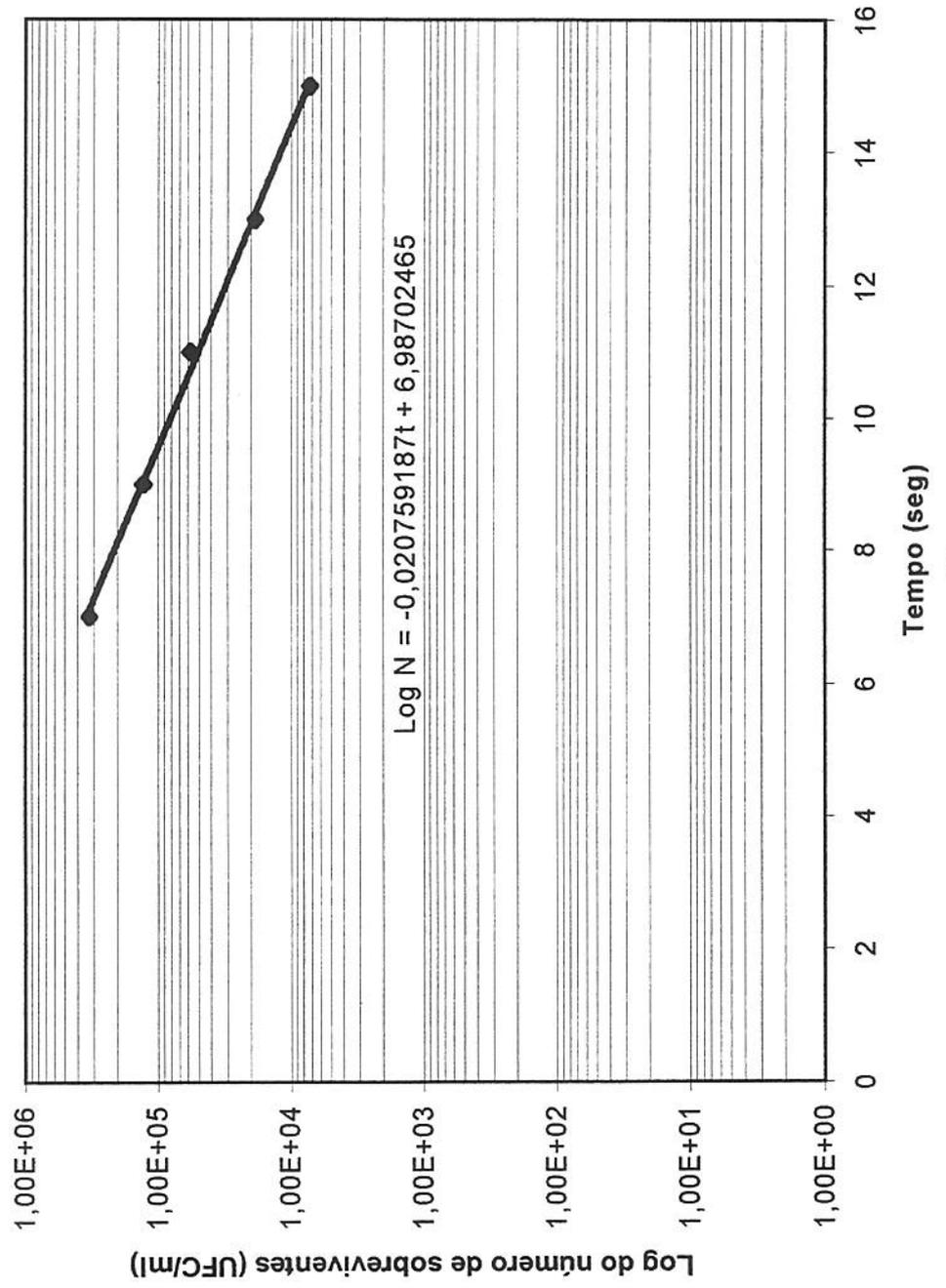
Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99860416
R-Quadrado	0,99721026
R-quadrado ajustado	0,99628035
Erro padrão	0,04009297
Observações	5

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,72377544	1,72377544	1072,36911	6,2589E-05
Resíduo	3	0,00482234	0,00160745		
Total	4	1,72859778			

ANOVA								
	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Interseção	6,98702465	0,07200009	97,0418837	2,4123E-06	6,757888	7,21616129	6,757888	7,21616129
Variável X 1	-0,20759187	0,00633925	-32,7470473	6,2589E-05	-0,22776623	-0,18741752	-0,22776623	-0,18741752
D(seg) =	4,81714425				4,39046648	5,33568055		

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à temperatura de 66°C/42,7UI de nisina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise estatística do tratamento número 4 do plano experimental. Temperatura=52°C e Nisina=25UI/ml
 Tempo(seg) Contagem Log(N)

0	5.15E+08	8.711807
600	1.49E+06	6.173186
960	6.40E+05	5.80618
1200	2.00E+05	5.30103
1500	6.20E+04	4.792392
1800	3.25E+04	4.511883
2400	4.50E+03	3.653213

RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0.996058
R-Quadrado	0.992131
R-quadrado ajustado	0.990164
Erro padrão	0.090924
Observações	6

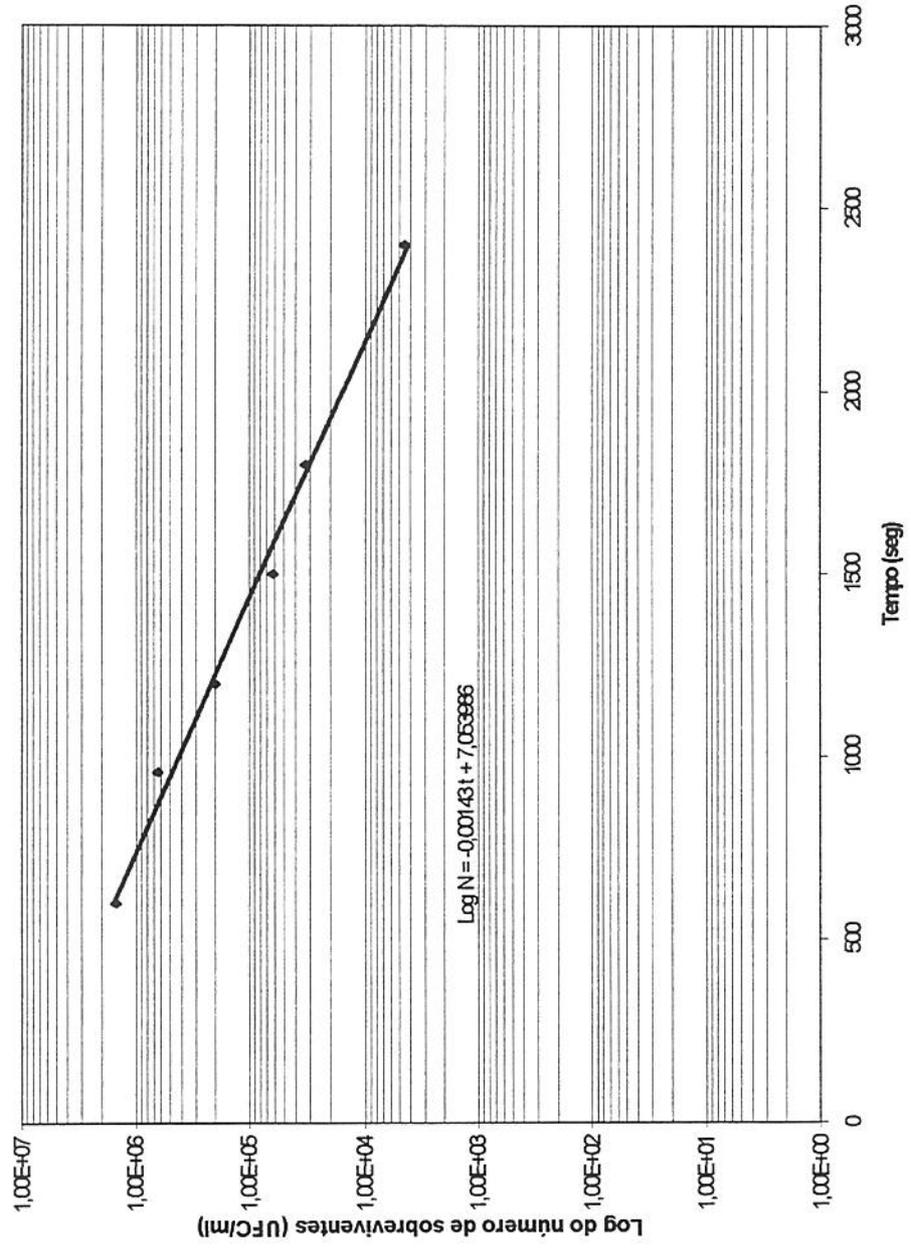
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	4.169607	4.169607	504.3553	2.33E-05
Resíduo	4	0.033069	0.008267		
Total	5	4.202675			

	Coefficient	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Interseção	7.053986	0.097072	72.66781	2.15E-07	6.784471	7.323501	6.784471	7.323501
Variável X 1	-0.00143	6.36E-05	-22.4579	2.33E-05	-0.00161	-0.00125	-0.00161	-0.00125
D(seg.)=	699.9816							

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à temperatura de 52°C/25U de nisina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise estatística do tratamento número 5 do plano experimental. Temperatura=60°C e Nisina= 25UI/ml

Tempos	Contagem	Log(N)
0	7,00E+08	8,84509804
40	1,35E+06	6,13033377
90	2,74E+04	4,43775056
120	3,50E+03	3,54406804
150	1,00E+03	3

RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99261193
R-Quadrado	0,98527844
R-quadrado ajustado	0,97791766
Erro padrão	0,20354578
Observações	4

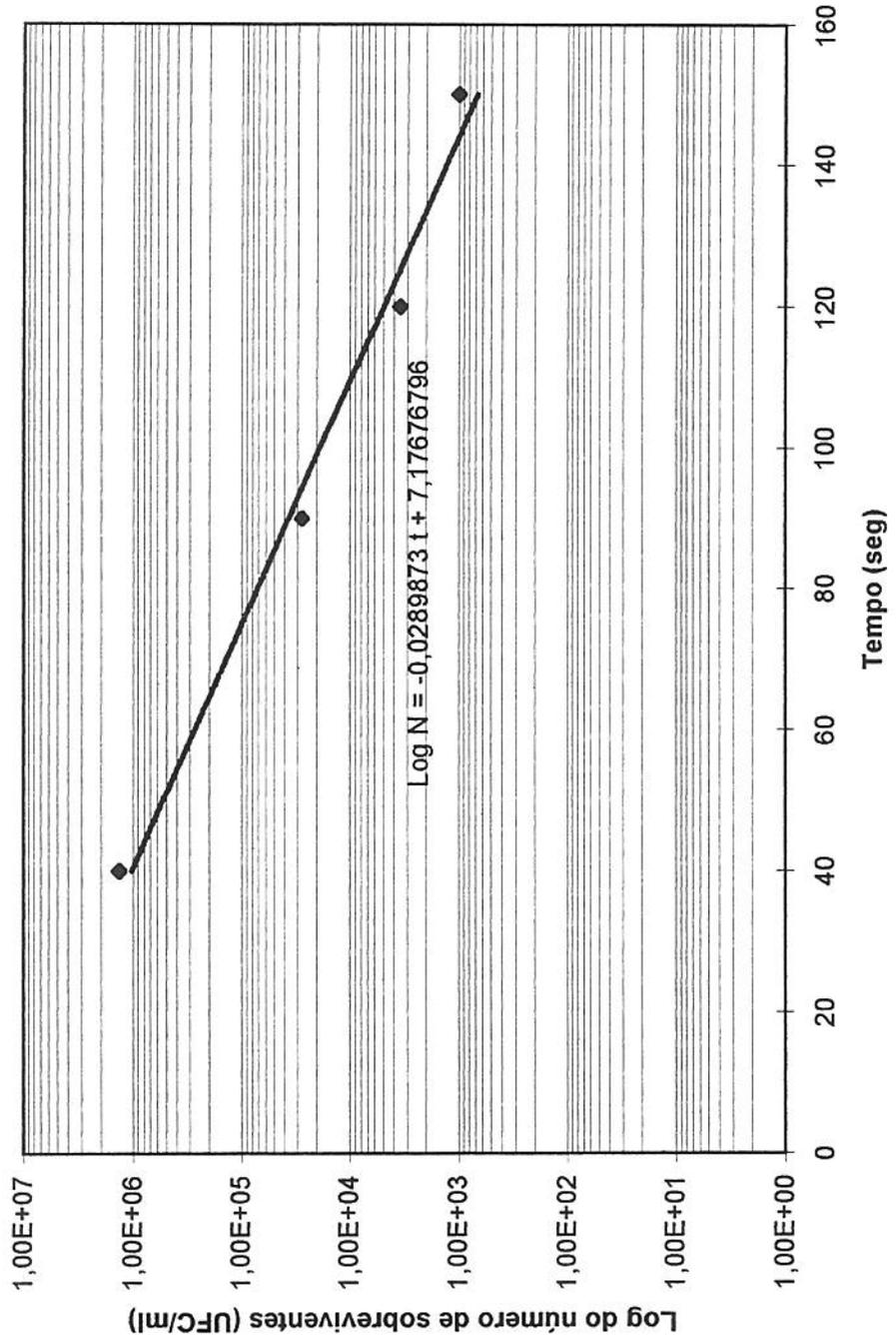
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	5,54573897	5,54573897	133,855193	0,00738807
Resíduo	2	0,08286177	0,04143088		
Total	3	5,62860074			

Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Interseção	7,17676796	0,2704289	26,5384657	0,00141685	8,34033039	6,01320552	8,34033039
Variável X 1	-0,0289873	0,00250548	-11,5695805	0,00738807	-0,0397675	-0,0397675	-0,0182071
D(seg)=	34,497868			25,1461643	54,9236262		

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à temperatura de 60°C/25UI de nisina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise estatística do tratamento número 6 do plano experimental. Temperatura=60°C e Nisina=50UI/ml

Tempo	Contagem	Log(N)
0	5,45E+08	8,7363965
10	6,00E+07	7,77815125
20	1,54E+07	7,18752072
30	1,63E+05	5,2121876
40	5,00E+04	4,69897
50	2,70E+04	4,43136376
60	6,00E+03	3,77815125
70	2,75E+03	3,43933269

RESUMO DOS RESULTADOS

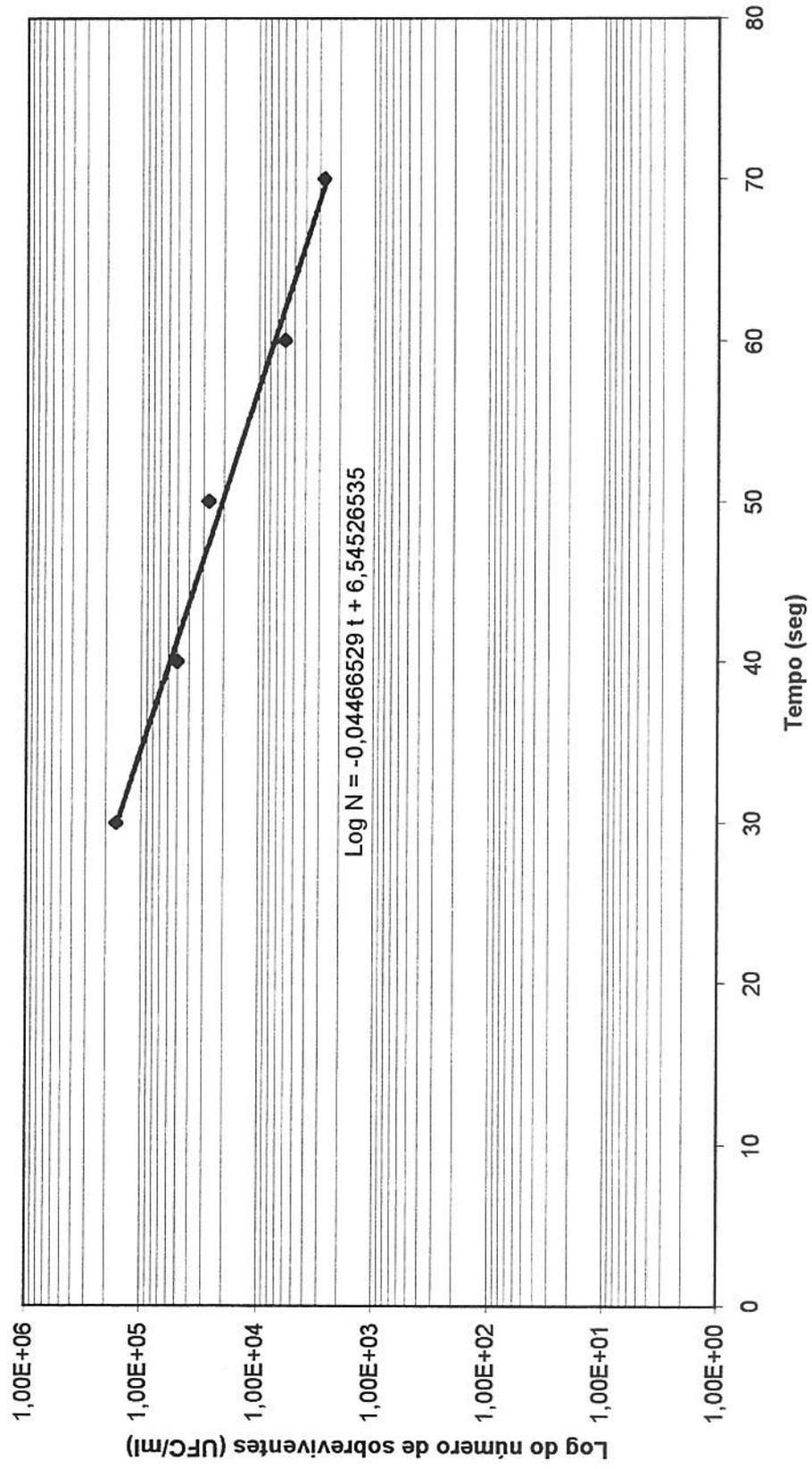
Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99357466
R-Quadrado	0,9871906
R-quadrado ajustado	0,9829208
Erro padrão	0,09289094
Observações	5

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,99498775	1,99498775	231,203038	0,00061767
Resíduo	3	0,02588618	0,00862873		
Total	4	2,02087393			

	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Interseção	6,54526535	0,15263539	42,8817033	2,7913E-05	6,05951097	7,03101973	6,05951097	7,03101973
Variável X 1	-0,04466529	0,00293747	-15,2053622	0,00061767	-0,05401363	-0,03531694	-0,05401363	-0,03531694
D(seg)=	22,3887519				18,5138444	28,3150252		

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à temperatura de 60°C/50UI de nisina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise estatística do tratamento número 7 do plano experimental. Temperatura=60°C e Nisina=25UI/ml

Tempos	Contagem	Log(N)
0	5,30E+08	8,72427587
40	1,15E+06	6,06069784
60	9,12E+04	4,95999484
90	2,45E+04	4,38916608
120	1,75E+03	3,24303805
150	1,25E+03	3,09691001

Sem utilizar este ponto

RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,96834146
R-Quadrado	0,93768517
R-quadrado ajustado	0,91691357
Erro padrão	0,35583393
Observações	5

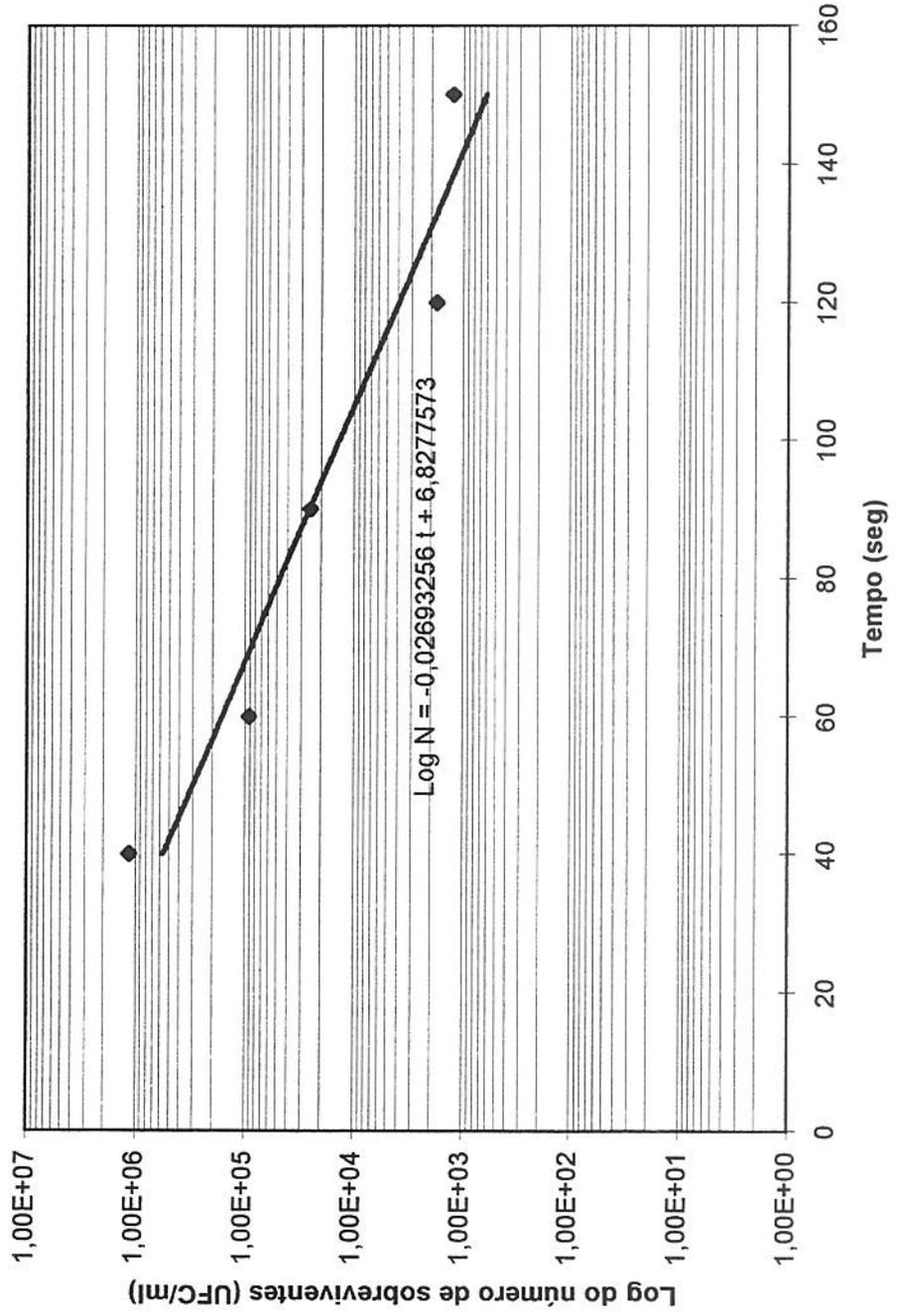
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	5,7158607	5,7158607	45,1426366	0,00672972
Resíduo	3	0,37985336	0,12661779		
Total	4	6,09571406			

Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Interseção	6,8277573	0,40165308	16,9991408	0,00044341	5,54951673	8,10599787	8,10599787
Variável X 1	-0,02693256	0,00400852	-6,71882702	0,00672972	-0,03968948	-0,01417565	-0,03968948
D(seg)=	37,1297727			25,1955922	70,5435163		

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à temperatura de 60°C/25 UI de nisina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise estatística do tratamento número 8 do plano experimental. Temperatura=60°C e Nisina= 25UI/ml

Tempos	Contagem	Log(N)
0	4,50E+08	8,65321251
60	7,35E+04	4,86628734
90	2,55E+04	4,40654018
120	3,75E+03	3,57403127
150	1,00E+03	3

RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99444058
R-Quadrado	0,98891206
R-quadrado ajustado	0,98336809
Erro padrão	0,10767631
Observações	4

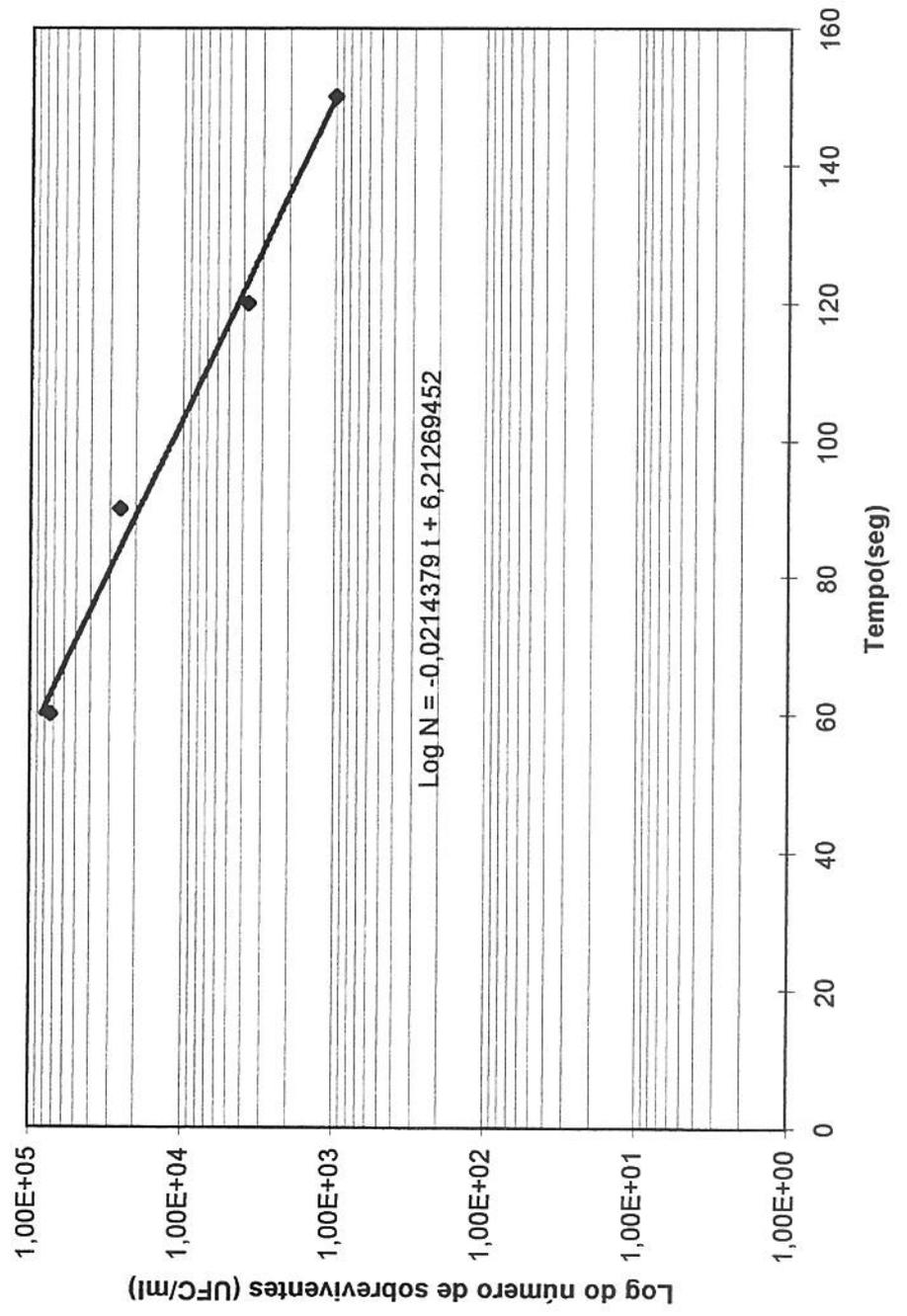
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	2,0681266	2,0681266	178,376169	0,00555942
Resíduo	2	0,02318837	0,01159419		
Total	3	2,09131498			

Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95%		Superior 95.0%
				inferiores	superiores	
Interseção	6,21269452	0,17693022	35,1138115	0,00081006	5,45142468	6,97396436
Variável X 1	-0,0214379	0,00160514	-13,3557542	0,00555942	-0,02834428	-0,01453152
D(seg)=	46,6463532		35,2804828	68,8159121		

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à temperatura de 60°C/25UI de nisina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise estatística do tratamento número 9 do plano experimental. Temperatura=55°C e Nisina=42,7UI/ml

Tempo(seg)	Contagem	Log(N)
0	5.00E+08	8.69897
300	1.20E+07	7.079181
600	1.90E+06	6.278754
900	2.22E+05	5.346353
1200	5.80E+04	4.763428
1500	1.30E+04	4.113943
1800	2.00E+03	3.30103

RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0.997806
R-Quadrado	0.995618
R-quadrado ajustado	0.994522
Erro padrão	0.102958
Observações	6

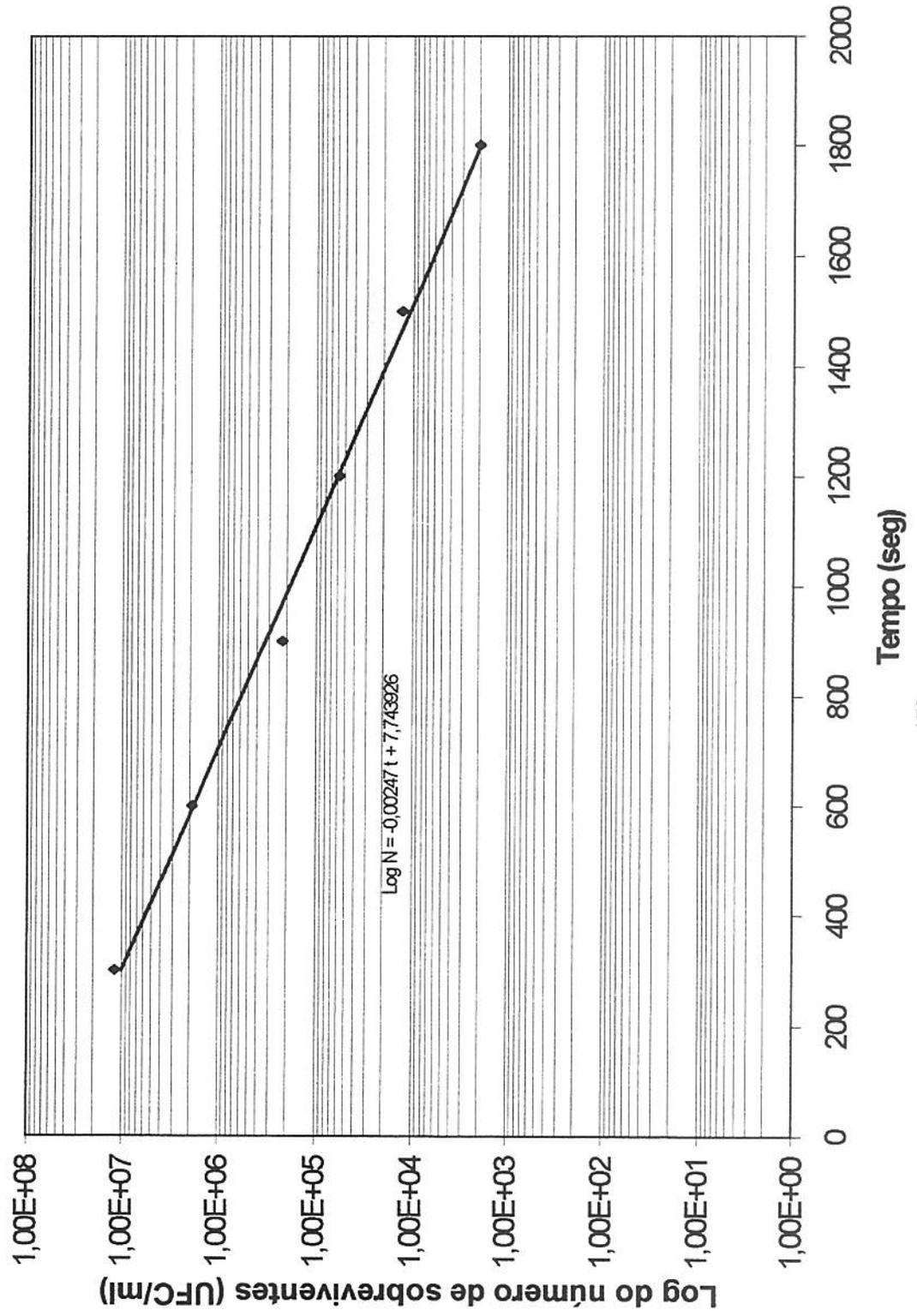
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	9.633469	9.633469	908.7803	7.21E-06
Resíduo	4	0.042402	0.0106		
Total	5	9.675871			

	Coefficient	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior	Superior
							95.0%	95.0%
Interseção	7.743926	0.095849	80.79291	1.41E-07	7.477806	8.010046	7.477806	8.010046
Variável X 1	-0.00247	8.2E-05	-30.146	7.21E-06	-0.0027	-0.00225	-0.0027	-0.00225
D(seg)=	404.3421							

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à temperatura de 55°C/42,7 UI de nisina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise estatística do tratamento número 10 do plano experimental. Temperatura=60°C e Nisina=25UI/ml

Tempo(seg)	Contagem	Log(N)
0	4,50E+08	8,65321251 sem utilizar este ponto
40	1,15E+06	6,06069784
60	6,90E+04	4,83884909
90	5,90E+04	4,77085201
120	4,00E+03	3,60205999
150	1,75E+03	3,24303805

RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,95919089
R-Quadrado	0,92004717
R-quadrado ajustado	0,89339623
Erro padrão	0,36541136
Observações	5

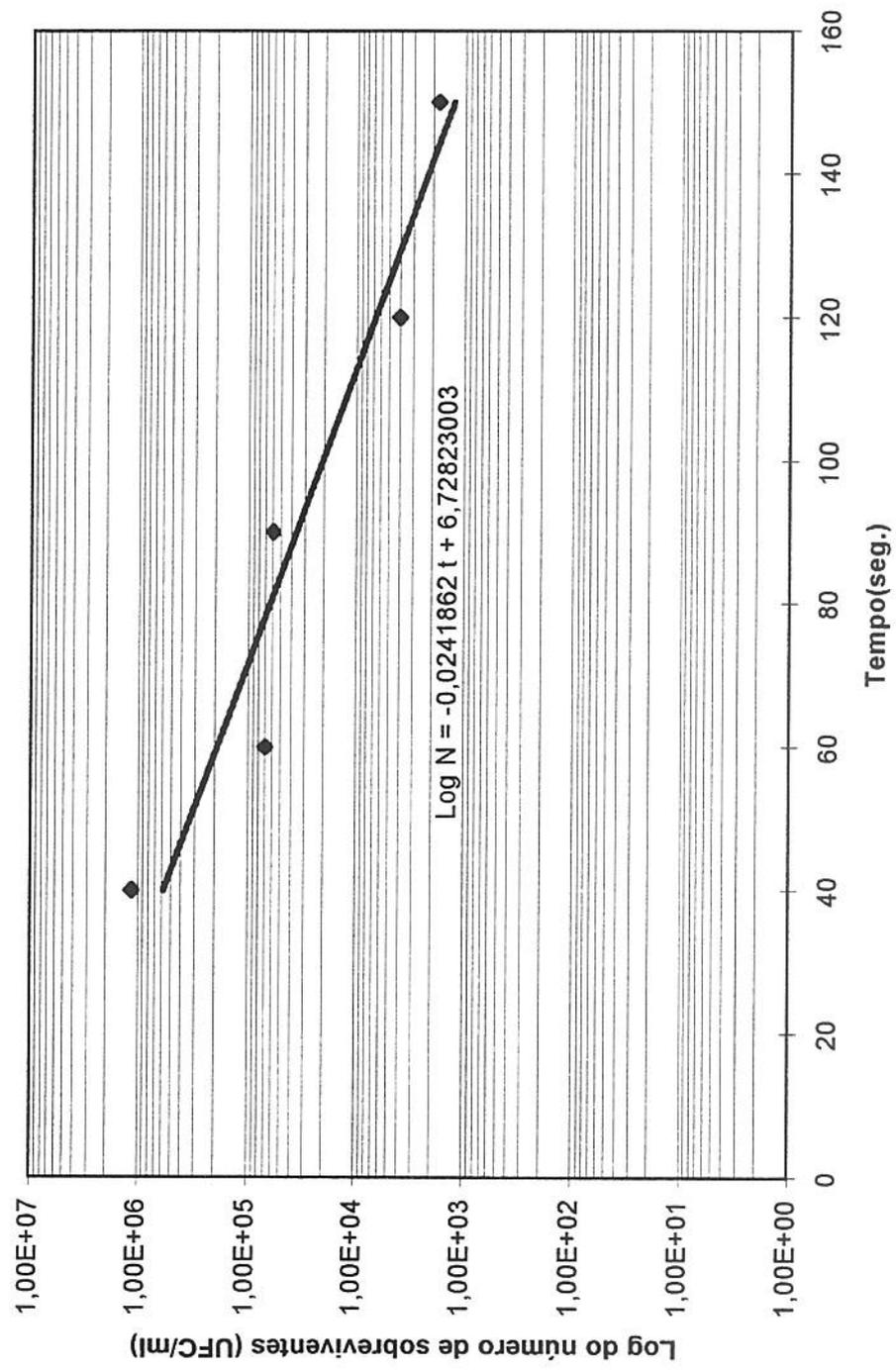
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	4,60958246	4,60958246	34,5221237	0,00983542
Resíduo	3	0,40057638	0,13352546		
Total	4	5,01015884			

Coeficientes		Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Interseção	6,72823003	0,41246375	16,312294	0,00050128	5,41558505	8,04087501	5,41558505	8,04087501
Variável X 1	-0,0241862	0,00411641	-5,87555305	0,00983542	-0,03728648	-0,01108593	-0,03728648	-0,01108593
D(seg)=	41,3458871				26,8193741	90,2044536		

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à temperatura de 60°C/25 UI/ml de nisina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise estatística do tratamento número 11 do plano experimental. Temperatura=60°C e Nisina=zero UI/ml

Tempo(seg)	Contagem	Log (N)
0	6.00E+08	8.778151
120	4.55E+07	7.658011
240	2.16E+06	6.334454
360	1.40E+05	5.146128
480	1.00E+04	4

RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0.999685
R-Quadrado	0.999369
R-quadrado ajustado	0.999159
Erro padrão	0.055347
Observações	5

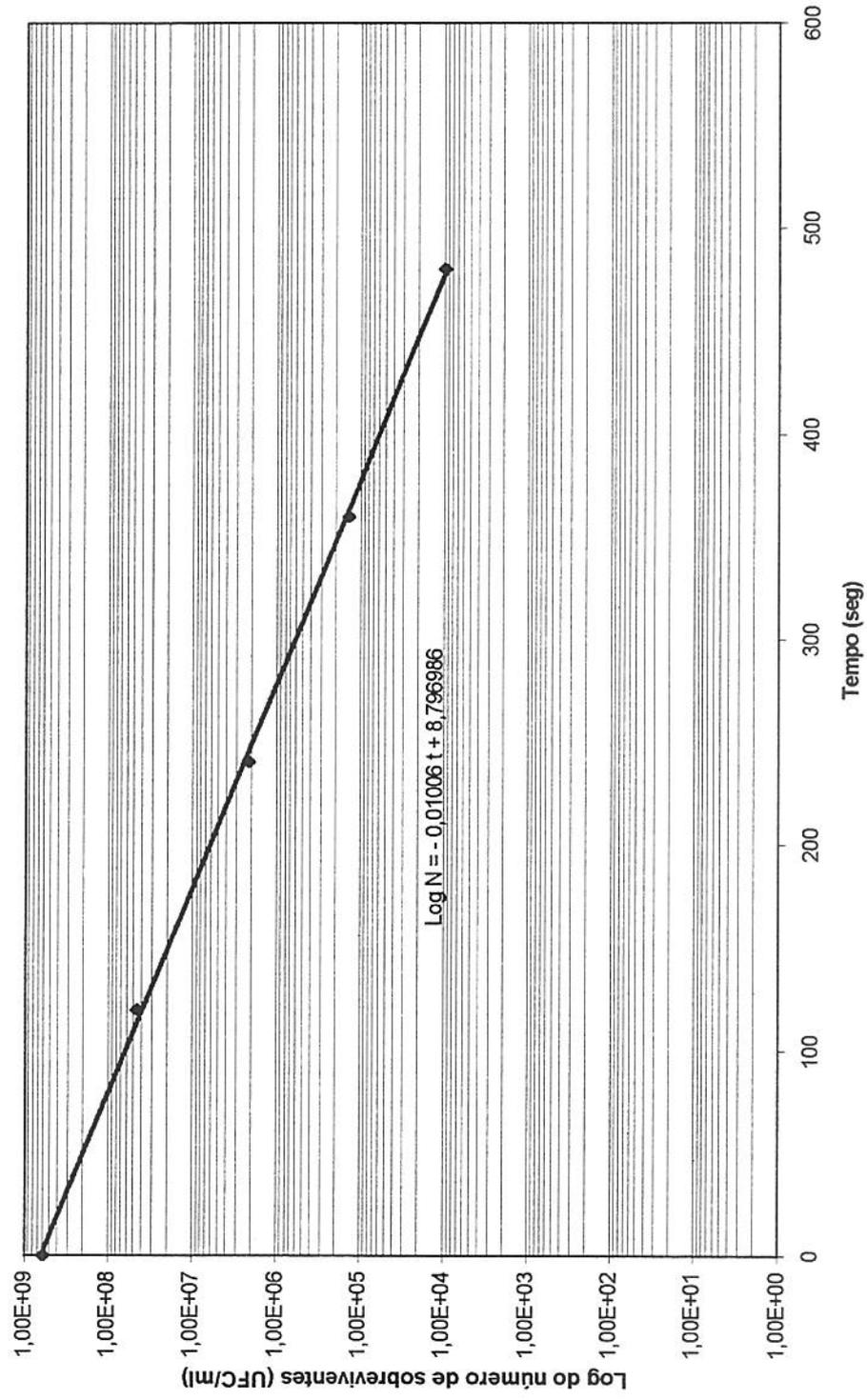
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	14.56411	14.56411	4754.355	6.72E-06
Resíduo	3	0.00919	0.003063		
Total	4	14.5733			

	Coefficient	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Interseção	8.796986	0.042872	205.1928	2.55E-07	8.660549	8.933423	8.660549	8.933423
Variável X 1	-0.01006	0.000146	-68.9518	6.72E-06	-0.01052	-0.00959	-0.01052	-0.00959
D(seg)=	99.43499							

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à temperatura de 60°C/zero UI de nisina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise estatística do tratamento número 12 do plano experimental. Temperatura=60°C e Nisina=25UI/ml

Tempo(seg)	Contagem	Log(N)
0	5,70E+08	8,75587486
60	1,06E+05	5,02530587
90	1,17E+04	4,06818586
120	4,50E+03	3,65321251
150	1,25E+03	3,09691001

sem utilizar este ponto

RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,98387483
R-Quadrado	0,96800968
R-quadrado ajustado	0,95201452
Erro padrão	0,17821423
Observações	4

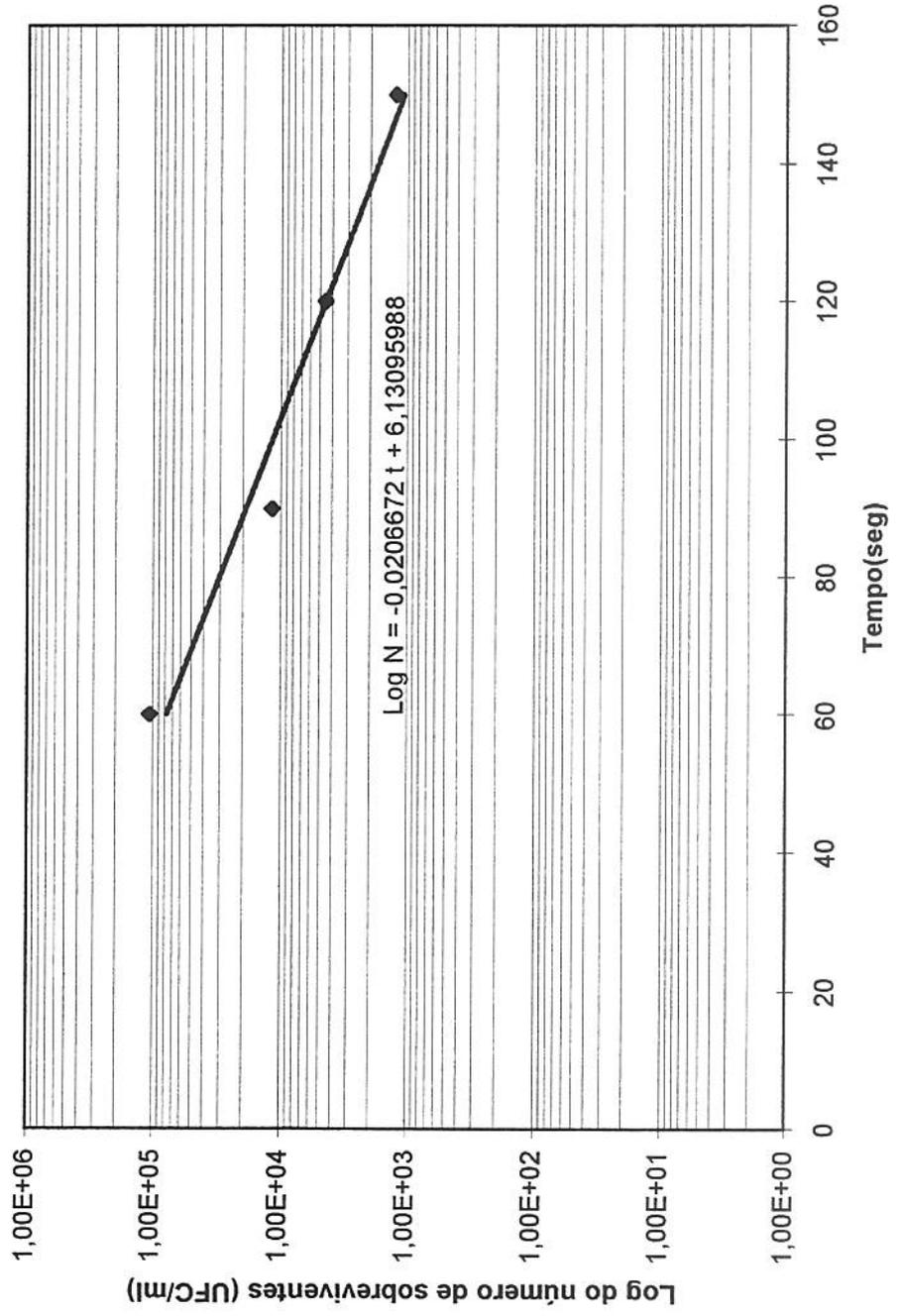
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,92209976	1,92209976	60,5189169	0,01612517
Resíduo	2	0,06352063	0,03176031		
Total	3	1,98562039			

Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Interseção	6,13095988	0,29283587	20,9365059	0,00227357	4,87098795	7,39093181	4,87098795
Variável X 1	-0,0206672	0,00265666	-7,77939052	0,01612517	-0,0320979	-0,00923651	-0,0320979
D(seg)=	48,385841			31,1546857	108,266053		

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à temperatura de 60°C/25 UI/ml de nisina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise estatística do tratamento número 13 do plano experimental. Temperatura=60°C e Nisina=25UI/ml

Tempo(seg)	Contagem	Log(N)
0	5,70E+08	8,75587486
60	9,60E+04	4,98227123
90	1,07E+04	4,02938378
120	5,00E+03	3,69897
150	1,25E+03	3,09691001

RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,98082644
R-Quadrado	0,96202051
R-quadrado ajustado	0,94303077
Erro padrão	0,18807246
Observações	4

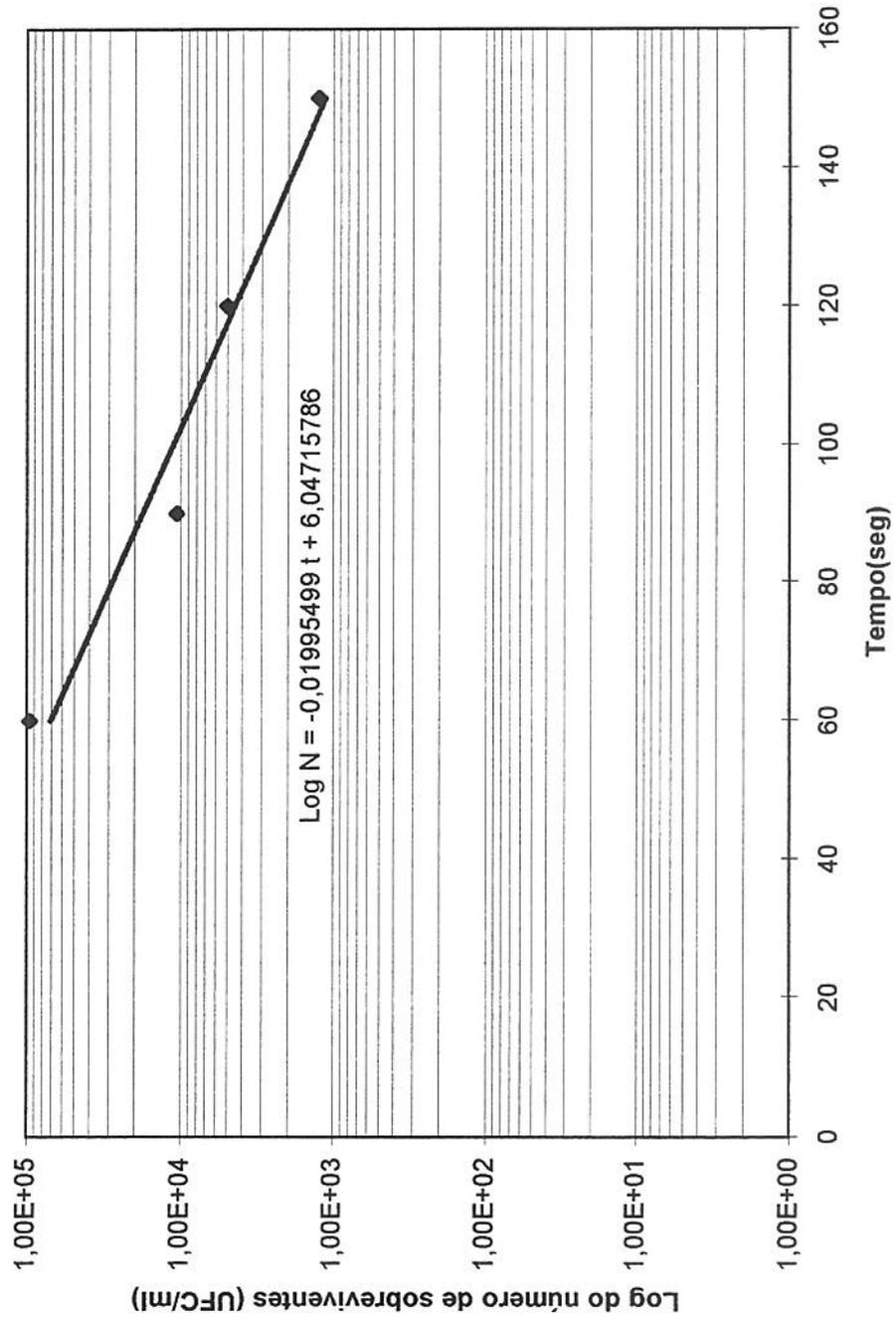
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,79190758	1,79190758	50,6600035	0,01917356
Resíduo	2	0,0707425	0,03537125		
Total	3	1,86265007			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	6,04715786	0,30903458	19,5679004	0,00260144	4,71748846	7,37682726	4,71748846	7,37682726
Variável X 1	-0,01995499	0,00280362	-7,1175841	0,01917356	-0,032018	-0,00789199	-0,032018	-0,00789199
D(seg)=	50,1127752				31,2324345	126,710823		

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à temperatura de 60°C/25 UI/ml de nisina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise estatística do tratamento número 14 do plano experimental. Temperatura=60°C e Nisina=25UI/ml

Tempo(seg)	Contagem	Log(N)
0	4,82E+08	8,68304704
60	1,40E+05	5,14612804
90	2,70E+04	4,43136376
120	3,75E+03	3,57403127
150	1,00E+03	3

RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99737644
R-Quadrado	0,99475977
R-quadrado ajustado	0,99213965
Erro padrão	0,0837248
Observações	4

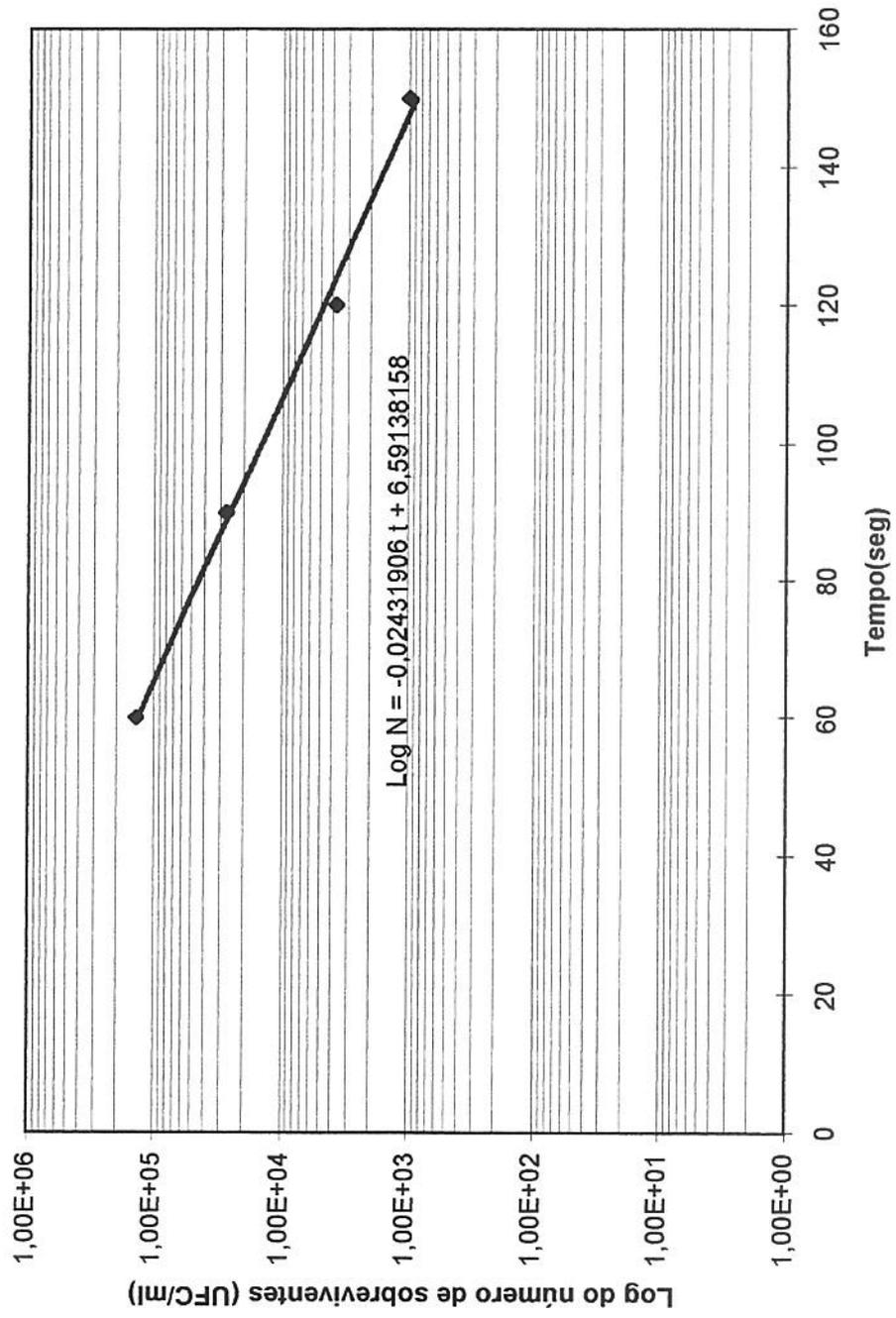
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	2,66137404	2,66137404	379,662481	0,00262356
Resíduo	2	0,01401968	0,00700984		
Total	3	2,67539372			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Interseção	6,59138158	0,13757388	47,9115758	0,00043535	5,99944852	7,18331464	5,99944852	7,18331464
Variável X 1	-0,02431906	0,0012481	-19,4849296	0,00262356	-0,02968918	-0,01894893	-0,02968918	-0,01894893
D(seg)=	41,1200183				33,6823032	52,7734296		

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à temperatura de 60°C/25 UI/ml de nisina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise estatística do tratamento número 15 do plano experimental. Temperatura=60°C e Nisina=25UI/ml

Tempo(seg)	Contagem	Log(N)
0	4,82E+08	8,68304704
60	1,10E+05	5,04139269
90	3,65E+04	4,56229286
120	6,00E+03	3,77815125
150	1,00E+03	3

RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99434996
R-Quadrado	0,98873185
R-quadrado ajustado	0,98309778
Erro padrão	0,1166083
Observações	4

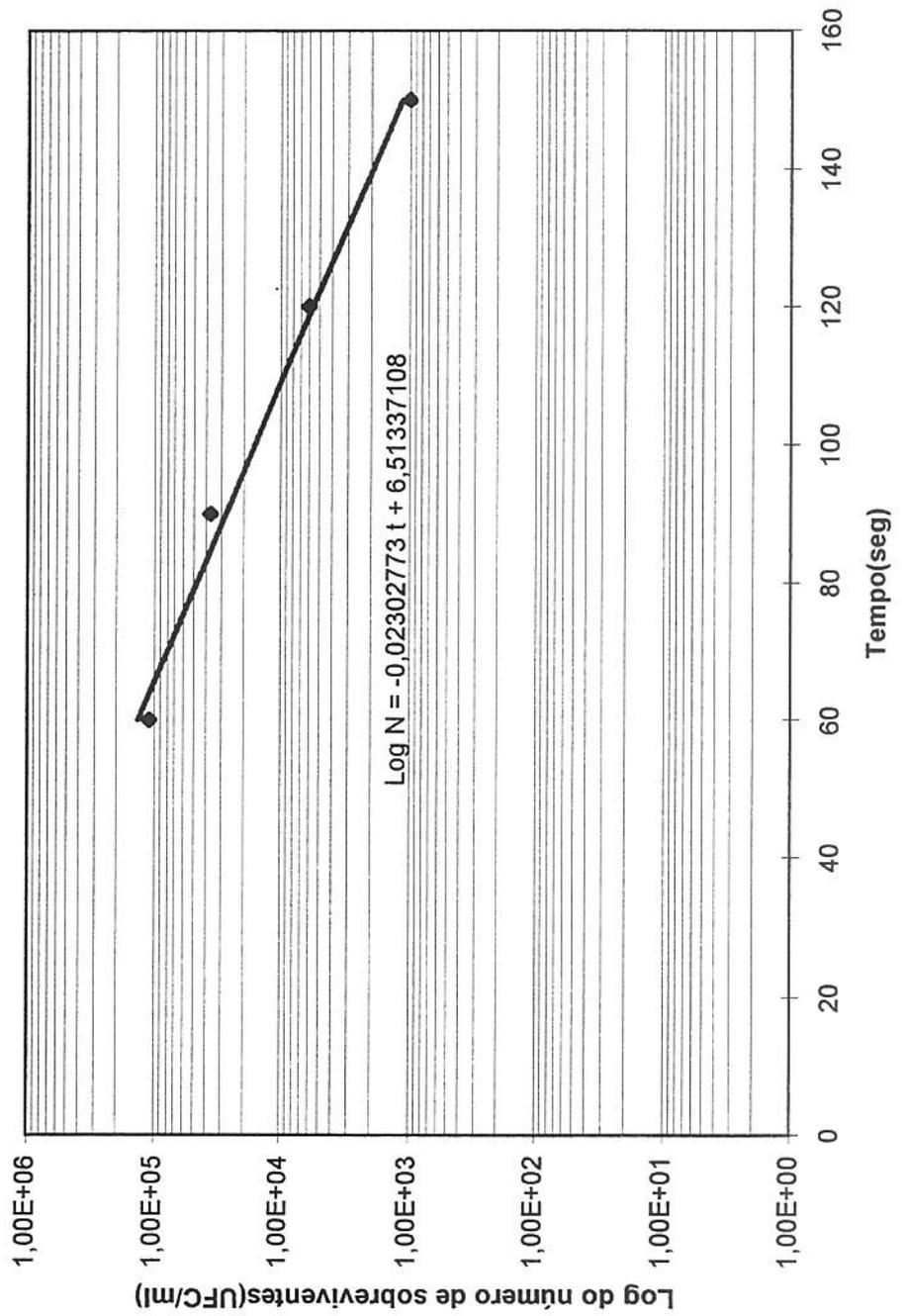
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	2,38624403	2,38624403	175,491447	0,00565004
Resíduo	2	0,02719499	0,01359749		
Total	3	2,41343902			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Interseção	6,51337108	0,19160698	33,993391	0,00086427	5,6889522	7,33778997	5,6889522	7,33778997
Variável X 1	-0,02302773	0,00173829	-13,2473185	0,00565004	-0,03050701	-0,01554845	-0,03050701	-0,01554845
D(seg)=	43,4259001				32,779349	64,3150832		

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à temperatura de 60°C/25 UI/ml de nisina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise estatística do tratamento número 16 do plano experimental. Temperatura=55°C e Nisina=7,3UI/ml

Tempo(seg)	Contagem	Log(N)
0	4.97E+08	8.696356
3600	1.20E+07	7.079181
7200	4.72E+05	5.673942
9000	4.72E+04	4.673942
10800	2.50E+03	3.39794

RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0.994328
R-Quadrado	0.988688
R-quadrado ajustado	0.984917
Erro padrão	0.253367
Observações	5

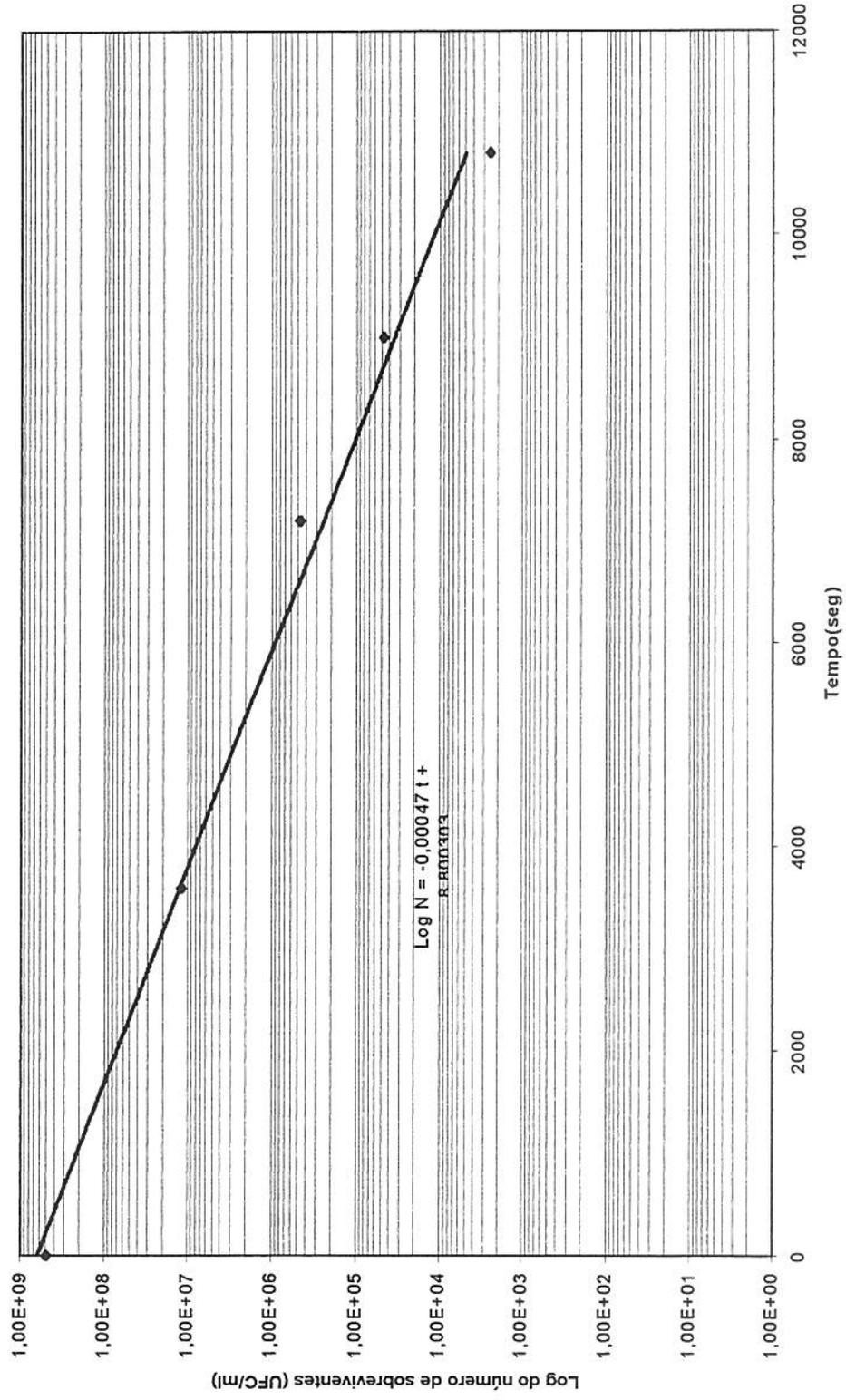
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	16.83203	16.83203	262.2022	0.000512
Resíduo	3	0.192584	0.064195		
Total	4	17.02461			

	Coefficient	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores superiores	95% inferiores superiores	Superior 95.0%
Interseção	8.800303	0.211721	41.5656	3.06E-05	8.126512	9.474094	8.126512
Variável X 1	-0.00047	2.92E-05	-16.1927	0.000512	-0.00057	-0.00038	-0.00057
D(seg)=	2113.237						

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à 55°C/7,3UI/ml de nislina



APÊNDICE 4 (continuação)

Análise estatística do tratamento selecionado através das respostas (Valor D). TEMP=64,4°C e NIS=26UI/ml

Tempo(seg) m	Contage	Log(N)
0	6,00E+08	8,778151
0,21	3,20E+07	7,50515
0,43	1,50E+07	7,176091
0,85	6,30E+05	5,799341
1,2	7,10E+03	3,851258

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de reregressão</i>	
R múltiplo	0,987079
R-Quadrado	0,974325

R-quadrado ajustado 0,965767

Erro padrão 0,347252

Observações 5

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressã	1	13,72798	13,72798	113,8456	0,00176
Resíduo	3	0,361753	0,120584		
Total	4	14,08974			

Coefficient	Erro	Stat	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior	Superior
es	padrão					95,0%	95,0%

Interseção 8,673327 0,247141 35,09464 5,09E-05 7,886813 9,459841 7,886813 9,459841 9,459841

Variável X
1 -3,81288 0,357351 -10,6698 0,00176 -4,95013 -2,67563 -4,95013 -2,67563 -2,67563

D(seg)= 0,262269 0,202015 0,373744

APÊNDICE 4 (continuação)

Curva de morte térmica à temperatura de 64,4°C/26,4UI de nisina

