

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Efeito da fermentação com *Lactobacillus sakei*
produtores de antagonismo no controlo de *Listeria
monocytogenes* e *Salmonella* spp. em chouriço de vinho**

**Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Qualidade
Alimentar**

Ana Filipa Pereira Afonso

***Orientador:* Luís Avelino da Silva Coutinho Patarata**



VILA REAL, 2014

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Efeito da fermentação com *Lactobacillus sakei*
produtores de antagonismo no controlo de *Listeria*
monocytogenes e *Salmonella* spp. em chouriço de vinho**

**Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Qualidade
Alimentar**

Ana Filipa Pereira Afonso

Orientador: Luís Avelino da Silva Coutinho Patarata

Composição do Júri:

Professora Doutora Ana Alexandra Mendes Ferreira

Professora Doutora Alexandra Sofia Miguens Fidalgo Esteves

Professor Doutor António Francisco Henrique Inês

Professor Doutor Luís Avelino da Silva Coutinho Patarata

Vila Real, 2014

Agradecimentos

Com este trabalho concluído resta-me agradecer a todas as pessoas que para ele contribuíram direta ou indiretamente, em especial:

Ao Professor Luís Patarata, excelente orientador deste trabalho, por todo o apoio, por todos os conhecimentos transmitidos, por todo empenho e pela dedicação demonstrada ao longo deste trabalho.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia por ter suportando financeiramente o projeto de investigação PTDC/AGR-ALI/119075/2010 SALSICHARIA TRADICIONAL PORTUGUESA: ESTRATÉGIAS PARA A MELHORIA DA SEGURANÇA E QUALIDADE em que se integrou este trabalho.

À Dona Ana Leite, ao Sr. Felisberto Borges e à Dona Fátima Silva, pelos conhecimentos transmitidos, pelo empenho e dedicação que sempre demonstraram para com este trabalho, assim como pela boa disposição durante o trabalho.

A todos aqueles que me apoiaram em especial à Sarinha pelos bons momentos passados durante o Mestrado, pelos conselhos e pela amizade. À Juliana, à Vera, à Manuela pelos momentos de alegria passados, pela partilha de dúvidas e conhecimentos. À Patrícia e à Márcia pelo apoio ao longo desta caminhada, por serem grandes amigas, sempre prontas a ajudar e a dar ânimo naqueles momentos mais aborrecidos.

A todos os meus colegas de laboratório, mas em especial à Liliana Fernandes por todos os momentos que passamos e pela interajuda.

Aos meus pais, por possibilitarem a minha progressão nos estudos, mesmo nos tempos difíceis que se vivem e ao meu irmão pela paciência em me aturar ao longo deste trabalho.

A todos os que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos o meu Muito Obrigada!

Índice Geral

Agradecimentos	i
Índice Geral	ii
Resumo	v
Abstract	vi
Lista de abreviaturas	vii
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1 Enchidos fermentados	4
2.2. Modo de preparação	5
2.3. Fatores que contribuem para a conservação de enchidos	10
2.4 Microflora envolvida na fermentação	13
2.5 Efeitos das BAL no controlo da microflora patogénica	16
2.5.1 Competição direta	16
2.5.2 Produção de ácidos	17
2.5.3 Produção de peróxido de hidrogénio	18
2.5.4 Outros compostos não péptidicos	18
2.5.5 Bacteriocinas	18
2.6 Importância da utilização de bacteriocinas em produtos cárneos	20

2.6.1 Tipo de bacteriocinas	20
2.6.2 Utilização de bacteriocinas em produtos cárneos	23
3. Material e Métodos.....	28
3.1. Desenho experimental.....	28
3.2. Microrganismos e condições de cultura.....	30
3.2.1. Bactérias do ácido láctico	30
3.2.2. Bactérias patogénicas testadas como microrganismo sensível	33
3.3. Despiste da produção de antagonismo de BAL	34
3.3.1. Comparação de métodos de despiste.....	34
3.3.2. Despiste de antagonismo	35
3.4. Efeito de condições de fabrico de chouriço na atividade de BLIS de <i>L. sakei</i> contra <i>Listeria monocytogenes</i>	37
3.4.1. Efeito da temperatura de crescimento, do pH e do teor em sal na produção de BLIS	37
3.4.2. Efeito da adição de vinho na detecção da atividade de BLIS	37
3.4.3. Efeito combinado da utilização de <i>L. sakei</i> produtores de BLIS, com vinho e glicídios fermentáveis em massa de chouriço.....	38
3.5. Análise de dados.....	40
4. Resultados e discussão	41
4.1 Confirmação da identidade de <i>L. sakei</i> e <i>L. plantarum</i> por PCR específica de espécie.....	41

4.2 Despiste da produção de antagonismo de BAL	41
4.2.1 Comparação de métodos de despiste.....	41
4.2.2 Despiste de antagonismos	43
4.3. Efeito de condições de fabrico de chouriço na atividade de BLIS de <i>L. sakei</i> contra <i>Listeria monocytogenes</i>	48
4.3.1. Efeito da temperatura de crescimento, do pH e do teor em sal na produção de BLIS	48
4.3.2. Efeito da adição de vinho na deteção da atividade de BLIS	58
4.3.3. Efeito combinado da utilização de <i>L. sakei</i> produtores de BLIS, com vinho e glícidos fermentáveis em massa de chouriço	59
5. Conclusões	68
6. Referências Bibliográficas	69

Resumo

A fermentação de produtos cárneos com BAL selecionadas é uma tecnologia que permite fabricar produtos seguros, pois essas bactérias contribuem para o controlo de alguns dos microrganismos patogénicos mais preocupantes na indústria de salsicharia.

O presente trabalho teve como objetivos (1) determinar a capacidade antagonista de *L. sakei* e *L. plantarum* previamente isolados de enchidos tradicionais contra alguns microrganismos patogénicos com maior importância ao nível alimentar, particularmente *L. monocytogenes*; (2) Estudar o efeito de condições de fabrico de chouriço na produção e ação do antagonismo contra *L. monocytogenes*, nomeadamente a temperatura de incubação da cultura, o pH e o teor em sal do meio de cultura e a ação do vinho na ação/deteção desse antagonismo; (3) Avaliar eficácia da utilização de *L. sakei*, conjuntamente com a ação do vinho comumente usado para temperar esse enchido, e a da adição de glícidos fermentáveis, em condições próximas das do fabrico de enchidos, no controlo de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. A determinação da atividade antagonista revelada por *L. sakei* e *L. plantarum* isolados de enchidos tradicionais demonstrou que neste ecossistema microbiano é possível encontrar estirpes interessantes para inibir *L. monocytogenes* e *S. aureus*, de entre outros. A produção de antagonismo por *L. sakei* contra *L. monocytogenes* foi influenciada pelo pH do meio de cultura, pelo seu teor em sal e pela temperatura de incubação. O pH de 5,5 foi o mais eficaz para a produção de *Bacteriocin Like Inibitory Substances* (BLIS). O teor em sal de 2% foi o mais favorável à produção de BLIS. A utilização de vinho em meio de cultura para testar a sua eventual interação com as BLIS produzidas por *L. sakei* contra *L. monocytogenes* não evidenciou qualquer efeito, provavelmente porque o método usado foi qualitativo e não quantitativo. A utilização de *L. sakei* em condições próximas das do fabrico de enchidos, usando uma preparação de carne picada com uma formulação semelhante à de chouriço mostrou ser útil no controlo de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. A associação da cultura de *L. sakei* com vinho, glícidos fermentáveis, ou com ambos mostrou-se ser mais eficaz do que a utilização isolada das culturas de arranque.

A utilização de culturas de arranque de *L. sakei* configura-se muito interessante para a segurança sanitária do chouriço seco cru, particularmente no que se refere ao controlo de *L. monocytogenes*. A sua utilização com o vinho usado para temperar resulta num controlo reforçado do microrganismo patogénico

Palavras-chave: enchidos fermentados, antagonismo, *Listeria monocytogenes*, bacteriocinas.

Abstract

The fermentation of meat products with selected LAB is a technology that allows to manufacture safe products once these bacteria contribute to the control of important foodborne pathogens in the meat products industry.

The objective of the present work was (1) to determine the antagonist potential of *L. sakei* and *L. plantarum* previously isolated from traditional dry-cured sausages against foodborne pathogens, particularly *L. monocytogenes*; (2) To study the effect of manufacture conditions of sausage on the antagonism against *L. monocytogenes* , namely the incubation temperature, pH and salt content of the medium, and the contribution of wine in the action/detection of this antagonism; (3) To evaluate the effectiveness of using *L. sakei* , combined with the action of the wine, commonly used to season these sausages, and the addition of fermentable carbohydrates in the control of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp.. It was observed that several strains of *L. sakei* and *L. plantarum* isolated from traditional sausages had antagonistic activity against pathogens. The production of antagonism against *L. monocytogenes* by *L. sakei* was influenced by the pH of the culture medium, its salt content and temperature of incubation. The pH of 5.5 was most efficient for production of Bacteriocin Like Inhibitory substances (BLIS). The salt content of 2 % was the most favorable for the production of BLIS. The use of wine in culture to test for their possible interaction with the BLIS produced by *L. sakei* against *L. monocytogenes* showed no effect, probably because the method is qualitative and not quantitative. The use of *L. sakei* in sausage manufacture shown to be useful in controlling *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. The association of *L. sakei* starter culture combined with wine, fermentable carbohydrates, or both was shown to be more effective than the single use of starter cultures . The use of starter cultures of *L. sakei* revealed to be very interesting for the safety of the dry raw sausage, particularly in the control of *L. monocytogenes*. Its use with the wine used to season the sausage results in better control of the pathogen .

Keywords: *fermented sausages, antagonistic, Listeria monocytogenes bacteriocins*

Lista de abreviaturas

BAL- bactérias do ácido lático

CCN- Cocos Coagulase Negativa

MRS- Main Rogosa Sharp

BHI- Brain Heart Infusion

APT- Água Peptonada Tamponada

a_w - atividade da água

BLIS- bacteriocin-like inhibitory substance

ns- não significativa

1. Introdução

A fermentação de produtos cárneos é uma tecnologia que permite fabricar produtos seguros, sensorialmente atraentes, e com potenciais vantagens para a saúde do consumidor (Khan *et al.*, 2011).

Os enchidos de carne não processados termicamente são conservados a partir de mecanismos de fermentação. O mecanismo de ação envolvido nessa inibição nem sempre é passível de ser individualizado, dado que existe uma complexa interação entre diferentes fenómenos para a produção de um efeito combinado. De entre os diferentes instrumentos de inibição de que esta microflora dispõe, e cuja ocorrência e intensidade relativa é condicionada por determinantes genéticos e ambientais, destaca-se a elevada capacidade de competição no meio específico do alimento fermentado, a produção de ácidos orgânicos, péptidos e proteínas com carácter antimicrobiano, genericamente designados por bacteriocinas, assim como a eventual produção de peróxido de hidrogénio, diacetilo, ou outros compostos com carácter antimicrobiano (Lindgren e Dobrogosz, 1990; Earnshaw, 1992). A produção de bacteriocinas é dos aspetos que, relativamente à capacidade de microrganismos produzirem a inibição de outros, tem ocupado intensamente os investigadores nos últimos anos. A designação – bacteriocina - engloba um grupo heterogéneo de péptidos e proteínas que exibem atividade inibidora contra microrganismos, habitualmente de espécies relacionadas com a do produtor, sendo comum inibirem elementos da sua própria espécie (Jack *et al.*, 1995). A possibilidade de explorar a utilização de bacteriocinas em alimentos fermentados decorre do facto de no espectro de ação de algumas se encontrarem bactérias patogénicas e/ou responsáveis pela deterioração do alimento e de conferir à bactéria produtora melhor competitividade no meio (Caplice *et al.*, 1999). Apesar de estes compostos serem produzidos por microrganismos pertencentes a um grande número de géneros, são os produzidos por BAL aqueles que maior interesse de estudo e aplicação prática apresentam no campo da conservação alimentar (Lucke, 1992).

O presente trabalho teve como objetivos:

(1) Determinar a capacidade antagonista de *L. sakei* e *L. plantarum* previamente isolados em enchidos tradicionais contra alguns microrganismos patogénicos com maior importância ao nível alimentar, particularmente *L. monocytogenes*.

(2) Estudar o efeito de condições de fabrico de chouriço na produção e ação do antagonismo contra *L. monocytogenes*, nomeadamente a temperatura de incubação da cultura, o pH e o teor em sal do meio de cultura e a ação do vinho na ação/detecção desse antagonismo.

(3) Avaliar eficácia da utilização de *L. sakei*, conjuntamente com a ação do vinho comumente usado para temperar esse enchido, e a da adição de glúcidos fermentáveis, em condições próximas das do fabrico de enchidos, no controlo de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Enchidos fermentados

Os produtos de salsicharia tradicional são, segundo as suas características organoléticas, produtos alimentares de alta qualidade, fazendo parte de um património cultural que interessa preservar. O termo “salsicharia” está associado a todos os produtos cárneos transformados, nos quais para além dos enchidos se encontram todas as carnes curadas como presuntos, pás, entre outros (Martins, 1984). Os enchidos são produtos cárneos pertencentes ao grupo dos preparados à base de carne, os quais se definem como produtos transformados resultantes da transformação da carne ou da ulterior transformação desses produtos transformados, de tal modo que a superfície de corte à vista permita constatar o desaparecimento das características da carne fresca (Regulamento CE n.º 853/2004). A sua elaboração constitui uma forma de conservação da carne, pelo que estes apresentam uma grande variedade comercial, de sabores, de textura e formas, como resultado da diversidade das matérias-primas, dos ingredientes utilizados e dos processos de fabrico (Feiner, 2006).

Os enchidos tradicionais portugueses são produtos únicos que têm normalmente especificidades associadas à zona geográfica de origem, as quais, em regra estão associadas à respetiva designação comercial, e que possuem uma forte ligação ao desenvolvimento dessa região (Ribeiro e Martins, 1995). O seu fabrico envolve uma fase de preparação da carne e tempero, enchimento, fumagem e secagem, podendo estas duas etapas ocorrer simultaneamente ou não (Colaço-do-Rosário *et al.*, 2000). A classificação destes produtos portugueses no grupo dos produtos curados ou fermentados não é óbvia, uma vez que a utilização da tecnologia de fermentação – com adição de culturas de arranque e glúcidos fermentáveis – não é comum no nosso país. Assim, esses produtos experimentam processos de cura, com utilização de cloreto de sódio e nitrato ou nitrito que são responsáveis por modificações da carne ao nível do sabor, cor e textura (Estévez *et al.*, 2007), mas têm muitas características de enchidos fermentados, nomeadamente contagens de bactérias do ácido láctico (BAL), de cocos coagulase negativa (CNS) e valores de pH compatíveis com as de produtos fermentados com inoculação de culturas de arranque (Patarata, 2002, Talon *et al.*, 2012).

A produção de enchidos tradicionais, tanto em pequenas unidades de fabrico como a um nível mais industrializado, deverá ser enquadrada segundo as exigências de segurança sanitária, numa perspectiva de proteção do consumidor e de valorização económica dos recursos locais. Os consumidores têm tendência para valorizar as características organoléticas e nutricionais dos produtos tradicionais, embora cada vez mais se destaque a importância quanto à segurança dos alimentos (Skandamis e Nychas, 2007).

De entre os muitos produtos de salsicharia tradicional portuguesa, o chouriço de carne é provavelmente o que tem maior importância comercial, pois representa uma grande parte da produção de muitas indústrias. O designativo “chouriço” é comumente utilizado para referência genérica a enchidos, sendo comum a referência a chouriço de sangue, chouriço de pão, chouriço doce, de entre outros (Melo *et al.*, 1991). No presente trabalho a referência a chouriço é utilizada exclusivamente para referência a chouriço de carne. O chouriço de carne é feito à base de carne e gorduras de porco picadas e misturadas com vinho ou pimentão, alho, sal e outras especiarias, condimentos e aditivos autorizados. Pode ser cheio em tripa natural ou artificial, sofre um processo de maturação/secagem, com ou sem fumo. Ao nível da produção industrial o chouriço pode ser classificado como corrente (feito com couratos cozidos ou salmoados) ou extra (feito com carnes selecionadas mais magras) (NP 589, 2008).

2.2. Modo de preparação

Desde as últimas décadas que o processo de fabrico dos enchidos passou a ser maioritariamente industrial, apesar de se basear nos processos tradicionais, pois este permite a obtenção de produtos diversificados mantendo o conceito base de enchido, assim sendo a oferta dos produtos de salsicharia é cada vez mais variada (Leistner, 1992). As modificações introduzidas no processo de fabrico relacionam-se fundamentalmente com a mecanização dos processos, a utilização de câmaras de secagem e/ou fumagem, que permitem o controlo da humidade relativa e da temperatura de forma a que a produção seja contínua ao longo do ano e em qualquer região independentemente das alterações climáticas (Almeida, 2009), assim como a introdução de culturas starter para melhores resultados na etapa da fermentação (Diez e Patarata, 2013). A tecnologia da produção de enchidos varia segundo o país produtor e a

região. As diferentes etapas do processo de fabrico dos enchidos tradicionais portugueses caracterizam-se por:

Seleção da matéria prima

A escolha consiste na seleção de carnes e da gordura mais adequada a cada tipo de enchidos. É das etapas mais importantes do processo de fabrico, pois a escolha das carnes deve permitir a obtenção de uma massa de composição equilibrada entre as frações muscular e lipídica. Um baixo teor em gordura reflete-se na qualidade da maior parte dos chouriços que se tornam secos e quebradiços, prejudicando a sua aparência, textura e flavour. Por outro lado quando se utilizam peças muito ricas em gordura, podemos obter um produto final com uma percentagem de matéria gorda que, para além de ultrapassar os limites aceitáveis, tem inconvenientes tecnológicos, como, baixo poder de retenção de água, difícil ligação da massa e mau aspeto (Sousa e Ribeiro, 1983, citado por Almeida 2009).

Redução de tamanho e preparação da massa

A miga é uma operação que tem por objetivo reduzir a carne e gordura a fragmentos menores, e cujas dimensões variam segundo o tipo de enchido (Sousa e Ribeiro, 1997). Após ser migada, a carne é colocada em recipientes apropriados, no qual se adicionam ingredientes essenciais ou facultativos, consoante a natureza do enchido: água, vinho ou vinagre, pão, arroz, farinha, sangue, salsa, pimentão, alho, cravinho, cominhos, colorau, entre outras especiarias (Melo *et al.*, 1991). Estas são de extrema importância, uma vez que conferem ao produto características organoléticas desejáveis e apreciáveis, contribuindo para a diversificação dos produtos. Por outro lado, os condimentos utilizados na aromatização podem contribuir para a conservação por inibição da atividade dos microrganismos deteriorativos e patogénicos (Incze, 1998).

Para além dos ingredientes adicionados cuja função primária é aromatizar o produto, são adicionados sal e nitrito e/ou nitrato (de sódio e/ou de potássio). Estes ingredientes, habitualmente designados por agentes de cura, estão associados ao desenvolvimento de características específicas. O sal, para além da implicação imediata no sabor e na capacidade de conservação, é responsável pelo desenvolvimento de

características de textura, nomeadamente a firmeza e ligação da massa do enchido, pela solubilização das proteínas miofibrilares que promove (Goutefongea, 1988). Os nitritos (E249 e E250) e nitratos (E251 e E252) são adicionados com uma função primariamente conservante, estando a sua incorporação legalmente limitada a máximos de 150 mg/kg adicionado (Regulamento UE 1129 de 2011). Deste par de conservantes, o nitrito tem um efeito inibidor de *Clostridium botulinum* comprovado, sendo o principal motivo da sua utilização. Como o nitrito é muito instável, a adição de nitrato aos enchidos garante que durante o seu fabrico e vida útil, há nitrito disponível no produto, proveniente da redução do nitrato. (Feiner, 2006). Para além da sua função conservante, o nitrito, e por inerência o nitrato, desempenham uma função de estabilizador da cor de característica dos produtos curados. O nitrito é reduzido a óxido nítrico, e é ligado no núcleo férrico da mioglobina, formando a nitrosomioglobina que confere aos produtos a cor rosa-vermelho característica e estável (Correia e Correia, 1985).

A adição de glúcidos à massa do enchido não é comum no fabrico de chouriço tradicional português (Barreto *et al.*, 1995). A utilização de glucose, lactose ou sacarose é comum quando se utiliza uma tecnologia de fermentação controlada com adição de culturas de arranque. O glícido mais vulgarmente utilizado para esse fim é a glucose, sendo também comum a utilização de lactose (Liepe *et al.* 1990). Em termos práticos, quando se pretende obter uma rápida redução do pH utiliza-se glucose, que é prontamente metabolizada, reservando-se para a lactose ou a sacarose para a função de um processo mais lento e com uma acidificação menos extensa (Petaja-Kanninen e Poulanne, 2007).

Após a preparação da massa, é comum que essa seja deixada a repousar durante tempo variável (desde poucas horas até 2 dias) em refrigeração. Durante esse período há penetração dos ingredientes na massa e começam a desencadear-se os processos de solubilização das proteínas miofibrilares e formação dos pigmentos de cura. Em função da temperatura utilizada, poderá começar a multiplicação da microflora láctica (Colaço-do Rosário *et al.*, 2000).

Enchimento

O processo de enchimento consiste em introduzir a massa previamente preparada numa tripa selecionada e disposta para esse fim. A tripa utilizada pode ser de natural ou sintética de colagénio ou celulose, dependendo das características do enchido e das condições tecnológicas, deve estar em boas condições higiénicas e integra, de forma a suportar as pressões necessárias à obtenção de um enchimento compacto (Barocco *et al.*, 1990). O enchimento realiza-se de modo a que a pasta entre sobre pressão e preencha a tripa e ao mesmo tempo se conseguia a dilatação máxima compatível com a sua elasticidade. Caso contrário ficam espaços com ar que prejudicam a qualidade dos produtos favorecendo a rancificação e a decomposição. Quando o enchimento é manual ou com equipamentos básicos, é necessário comprimir e ajustar à mão pelo lado externo obtendo-se uma distribuição uniforme. Após atadura, para facilitar a saída de ar e água indesejáveis ao produto, os enchidos tradicionais são picados em toda a sua extensão com o auxílio de uma agulha (Janeiro, 1948). Com equipamentos mais modernos a compactação e secção das unidades são efetuadas mecanicamente (Anónimo, 1999).

Fumagem

A fumagem é uma das técnicas mais antigas utilizadas na conservação dos enchidos e outros produtos cárneos. A fumagem é um procedimento tecnológico em que os produtos são submetidos à ação de compostos químicos obtidos pela combustão lenta das madeiras não resinosas e bem secas. Alguns desses compostos têm propriedades conservantes e conferem características sensoriais aos enchidos (Fraqueza e Patarata, 2006). Para isso, os enchidos são colocados em câmaras, estufas, fumeiros ou à lareira, ficando completamente sujeitos ao fumo. No início, a fumagem tem por objetivo a penetração do fumo no enchido, facilitada pela grande humidade de que este dispõe. Progressivamente, com o aquecimento melhoram-se as condições de desenvolvimento das BAL e consequentemente a acidificação torna-se mais intensa. Nesta fase começa a desidratação do produto, com reflexos na redução da a_w (Andrés *et al.*, 2007).

Adicionalmente, os compostos fenólicos do fumo exercem uma ação antioxidante que tem como consequência retardar a degradação oxidativa dos lípidos e uma ação bacteriostática, que permite estabilizar a carga microbiana do produto

fumado. Estas ações refletem-se nas qualidades higiénica e organolética dos produtos finais.

A ação conservante do fumo é exercida pelo efeito combinado do aquecimento, da secagem e dos compostos químicos com ação antimicrobiana, como os aldeídos, os fenóis e os ácidos (Prandl *et al.*, 1994). A cor dos produtos fumados resulta da sedimentação de substâncias corantes, principalmente compostos voláteis do grupo dos fenóis, os quais sofrem polimerização ou oxidação. No entanto, a principal causa da coloração escura durante a fumagem reside nas reações de escurecimento não enzimático ou reação de Maillard (Sousa e Ribeiro, 1997). O sabor característico que os produtos fumados apresentam, deve-se à reação que ocorre entre uma mistura de vários componentes do fumo e a matéria-prima. As proteínas reagem primeiro com os compostos com grupos carbonilo, seguindo-se os fenóis e os ácidos carboxílicos, sendo essencialmente estes os responsáveis pelo aroma a fumo (Sousa e Ribeiro, 1997).

A duração e a temperatura da fumagem variam com o tipo de enchido existindo uma relação entre a natureza e a dimensão do enchido e a intensidade do fumo. No caso dos enchidos, como o chouriço tradicional português, a fumagem deve realizar-se a frio (temperatura inferiores a 25°C), prolongando-se assim a fase de maturação (Fraqueza, 2003).

Secagem

A secagem dos alimentos é um dos métodos mais antigos de conservação, onde a água é evaporada pela exposição do alimento ao calor e/ou ambientes de humidade relativa reduzida. A secagem é o processo mais importante a considerar na conservação e segurança sanitária do chouriço, pois a reduzida atividade da água que determina assegura que o produto, preparado em boas condições higiénicas, é seguro (Diez e Patarata, 2013, Linares *et al.* 2013). A secagem consiste na colocação dos enchidos em câmaras com controlo de temperatura e humidade relativa. A duração pode variar entre 10 e 120 dias, consoante o tipo de produto, diâmetro e tamanho (Prandl *et al.*, 1994).

No caso de produtos de salsicharia secos e curados, a secagem deverá ser controlada de modo a evitar que o produto fique demasiado seco ou com demasiada humidade. Sendo que, no último caso pode ocorrer o crescimento de bolores e leveduras e, ainda, o aparecimento de limo à superfície do produto.

Este processo deve ser executado de forma a eliminar a água do centro para a periferia do produto. Após esta fase, os enchidos são considerados prontos a ser consumidos, contudo, continuam a decorrer transformações bioquímicas, mas com menos intensidade. A intensidade da secagem pode ser variável, influenciando as propriedades físico-químicas e organoléticas do produto e promovendo a sua estabilidade durante o armazenamento (Fraqueza e Patarata, 2006).

Acondicionamento do produto

Até chegar ao consumidor final a grande maioria dos produtos alimentares, independentemente do tipo de processamento que sofrem, passam por uma rede de armazenamento, distribuição e retalho, na qual a embalagem desempenha um importante papel na manutenção da quantidade e qualidade inicial do produto, contribuindo para o alargamento da sua vida útil (Coma, 2008). As embalagens devem cumprir vários requisitos, que são estabelecidos legalmente. Estas, por um lado, devem conferir proteção ao produto, servir de suporte a todas as informações legais e de orientação para o consumidor, por outro serem neutras e não reagirem com o produto, permitirem um manuseamento adequado durante a distribuição, facilitarem a automatização, serem de fácil abertura e nalguns casos também fáceis de voltar a fechar, ser apelativa, serem capazes de quando necessário resistirem ao processamento térmico, tiver um custo adequado às necessidades e serem facilmente recicláveis (Ahn e Min, 2007).

2.3. Fatores que contribuem para a conservação de enchidos

Os enchidos secos crus, curados e/ou fermentados devem a sua conservação fundamentalmente ao facto de terem desidratado. A maioria dos produtos de salsicharia tradicional portuguesa, assim como outros do mesmo tipo produzidos no sul da Europa, são submetidos a uma desidratação parcial que, conjuntamente com outros processos, assegura a redução do teor em água (a_w) para valores que garantem a estabilidade, sem que as características de textura (tenrura, suculência) sejam comprometidas. Essa redução da atividade da água é consequência não só da eliminação da água, mas

também da adição de sal e outros ingredientes solúveis no tempero dos produtos. A utilização de temperaturas reduzidas durante o fabrico, a fumagem e alguns dos ingredientes utilizados (sal, vinho, alho, de entre outros) contribuem também para a eliminação ou inibição da multiplicação dos microrganismos patogénicos. Quando se utiliza uma tecnologia de fermentação, a redução de pH pode ser um importante contributo para a conservação, mas não é o que habitualmente acontece nos enchidos tradicionais portugueses (Patarata, 1995).

Atividade da água (a_w)

A estabilidade física, química e microbiológica dos alimentos depende do seu teor em água e da sua interação com os seus constituintes. A carne crua contém cerca de 75% de água, pelo que num alimento deve-se distinguir a água na sua forma livre e ligada. De forma a exprimir a água livre nos alimentos recorre-se ao conceito da atividade da água – a_w (Rahman *et al.*, 1999). A a_w é um parâmetro físico-químico que possibilita avaliar a fração de água disponível nos alimentos para participar nas reações do metabolismo microbiano e físico-químico e na atividade enzimática, constituindo uma ferramenta importante e utilizada frequentemente, como referência para a determinação da estabilidade e segurança sanitária dos géneros alimentícios (Sablani *et al.*, 2007).

Tanto o crescimento como o metabolismo dos microrganismos exige a presença de água numa forma disponível e a a_w é um índice desta disponibilidade para a utilização em reações químicas e no crescimento microbiano. A maior parte das bactérias patogénicas é controlada quando a a_w é inferior a 0.85, sendo que a produção de toxinas é na maioria dos casos inibida a valores ligeiramente superiores a 0.90.

Os valores da a_w variam entre 0 e 1, para a água pura, sendo que quanto mais baixo for este valor num alimento, maior será a sua estabilidade. A redução da atividade da água pode ser conseguida ora retirando água do alimento, através da desidratação, ora retendo a água aí presente, através da adição de humectantes, como o sal ou o açúcar (Forsythe, 2002).

Dada a importância atribuída a este parâmetro podemos classificar os alimentos em três categorias: Alimentos de humidade elevada ($0.90 < a_w < 1.00$); Alimentos de humidade intermédia ($0.60 < a_w < 0.90$) e Alimentos de humidade reduzida ($a_w < 0.60$)

(Leistner e Rodel, 1976). Segundo esta classificação, os produtos de salsicharia tradicional portuguesa estão inseridos na categoria dos alimentos de humidade intermédia, com valores de a_w entre 0.87-0.90, cujo valor contribui para a sua estabilidade. Este tipo de alimentos pode ser armazenado sem o recurso a frio. Mas, é necessário ter em atenção que a heterogeneidade das matérias primas utilizadas em conjunto com diferentes processos de fabrico, faz com que sejam obtidos produtos com diferentes características e, consequentemente com graus de segurança diferentes. Assim, é de referir, que no intervalo de atividade da água entre 0.60 e 0.90, existem certos microrganismos que se mantêm ativos no produto, não devendo por isso ser negligenciados (Peres, 2000; Schmidt *et al.*, 2008).

pH

No fabrico de produtos de salsicharia tradicional, o pH pode representar um importante obstáculo ao desenvolvimento microbiano. Para controlar este parâmetro, é importante conhecer o pH das matérias-primas, assim como os processos que levam à sua redução, a fermentação e a adição de ácidos.

O pH inicial da carne, que pode apresentar variações consideráveis em função das condições que antecederam o abate do porco, desde valores considerados normais – 5,4-5,8 até valores consideravelmente superiores a 6 (Pearson, 1994).

No processo de fermentação as BAL fermentam as hexoses maioritariamente a ácido láctico, em condições normais de excesso de substrato e acesso limitado a oxigénio, podendo formar também quantidades pequenas de ácido acético (Axelsson, 1993).

Outros ingredientes utilizados no fabrico de enchidos, nomeadamente o vinho utilizado com finalidade aromatizante (Patarata *et al.*, 2005) e alguns aditivos de reguladores de acidez podem ser utilizados para controlar o pH dos enchidos (Feiner, 2006).

Considerando a importância dos parâmetros de atividade da água e pH na conservação dos alimentos, foi possível quanto à sua estabilidade, constituir três categorias de produtos (quadro 2.1):

Quadro 2.1. Condições de armazenagem de produtos cárneos em função de a_w e pH (Diretiva Sanitária nº 77/99/CEE de 21 de Dezembro de 1979, adaptado por Patarata, 2005)

Categoria	Critério	Temperatura de armazenagem
Estáveis	$a_w \leq 0,95$ e $pH \leq 5,2$	Não necessita de refrigeração
	ou $a_w \leq 0,91$	
Alteráveis	ou $pH \leq 4,5$ $a_w \leq 0,95$	
	ou $4,5 < pH \leq 5,2$	$\leq 10^\circ C$
Facilmente alteráveis	$a_w > 0,95$ e $pH > 5,2$	$\leq 5^\circ C$

2.4 Microflora envolvida na fermentação

Em 1983, Liepe constatou que é impossível produzir enchidos a partir de uma mistura de carne, sal e outros aditivos, sem a presença de microflora ativa. Como na sua formulação, os enchidos têm misturas de carne, sal, vinho, água, especiarias e de microflora específica que se desenvolve no produto sendo diferente da que se encontra presente na carne fresca (Lechowich, 1976).

Os produtos cárneos fermentados são deliberadamente incubados ou maturados durante o seu ciclo de produção, permitindo assim uma atividade microbiana suficiente para produzir modificações nas características do produto. Apesar dos microrganismos geralmente serem considerados prejudiciais no processamento da carne, nos produtos fermentados a tecnologia de fabrico baseia-se numa atividade microbiana controlada de tipos de bactérias específicos e por vezes também de leveduras (Bacus, 1986). Predominantemente neste tipo de produtos os grupos de microrganismos existentes são halotolerantes, mesófilos, cocos Gram- positivos, bactérias ácido lácticas, bolores e leveduras (Vasiloupolos *et al.*, 2008).

Tal como outros produtos alimentares, para que o produto a fermentar esteja provido da microflora mais adequada, existem essencialmente dois processos, para além da fermentação com a microflora presente naturalmente na matéria-prima, retro inoculação, feita a partir de material vindo de um lote já fermentado ou em fermentação, e a utilização de culturas de arranque (Ricke *et al.*, 1997).

O uso de culturas de arranque é mais frequente ao nível do fabrico industrial de enchidos fermentados, uma vez que, a adição de microrganismos desejáveis à carne pode ser vantajosa para a obtenção do produto final. A adição de microrganismos, ou o favorecimento do seu desenvolvimento nos produtos cárneos, têm como propósito incrementar a segurança sanitária e a capacidade de conservação através da inibição de microrganismos patogénicos ou deteriorativos, providenciarem modificações organoléticas promovendo assim a diversidade de produtos oferecidos ao consumidor e proporcionar benefícios específicos para a saúde humana (Lucke, 2000; Toldrá, 2006).

Dos microrganismos envolvidos na fermentação de produtos cárneos encontram-se as bactérias do ácido láctico (BAL) e cocos coagulase negativa (CCN), e em alguns casos, bolores e leveduras. As BAL são utilizadas fundamentalmente pela produção de compostos com carácter antimicrobiano, dos quais se destacam os ácidos, cujas consequências quer ao nível da capacidade de conservação e segurança sanitária, quer ao nível das características organoléticas são inquestionáveis. Aos restantes elementos, e particularmente aos CCN, têm sido atribuídas responsabilidades na redução de nitrato e degradação de peróxido de hidrogénio, com vantagens ao nível da qualidade e estabilidade da coloração do produto, assim como na degradação de compostos azotados e lipídicos, com consequências não negligenciáveis ao nível do flavor dos produtos (Liepe *et al.*, 1983; Lucke *et al.*, 1986; Leroy *et al.*, 2004; Leroy *et al.*, 2006).

Segundo, a síntese apresentada por Hammes e Hertel (1998), a espécie de BAL empregue como culturas de arranque pertencem principalmente aos géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Pediococcus*, dos quais se destacam as espécies *Lactobacillus curvatus*, *L. sakei*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus*. Destes, as três primeiras espécies de *Lactobacillus* e as de *Pediococcus* são as que frequentemente são mais utilizadas como culturas de arranque em enchidos fermentados (Montel *et al.*, 1994).

As BAL são bacilos ou cocos Gram-positivos não móveis, ou raramente móveis, que não formam endosporos. São microrganismos quimioorganotróficos com metabolismo estritamente fermentativo e incapazes de sintetizar grupos porfirínicos, tais como o grupo heme (Stamer *et al.*, 1979 citado por Inês *et al.*, 2008; Kandler *et al.*, 1983). Estas podem ser divididas em três grupos de acordo com o metabolismo dos glícidos em: BAL homofermentativas obrigatórias, BAL heterofermentativas obrigatórias e heterofermentativas facultativas. Apesar de serem aerotolerantes, estas

são bactérias características de ambientes anaeróbios, são exigentes do ponto de vista nutritivo e suportam valores de pH muito baixos, sendo a tolerância à acidez uma característica variável dependente da estirpe (Holzapfel *et al.*, 1995).

Os CCN usados no fabrico de enchidos pertencem predominantemente aos género *Staphylococcus*. As espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa utilizadas em culturas de arranque são apatogénicas e pertencem principalmente às espécies de *S. xylosus* e *S. carnosus*. Contudo, também se tem apontado como potenciais componentes de culturas de arranque espécies de *S. equorum* e algumas de *Kocuria* (Hammes *et al.*, 1998; Montel *et al.*, 1998).

Os CCN caracterizam-se são bactérias Gram-positivas, geralmente não móveis, aeróbias ou anaeróbias facultativas com metabolismo respiratório e/ou fermentativo, geralmente são catalase positivos e oxidase negativa, isto é, geralmente apresentam metabolismo fermentativo e sobrevivem em condições de anaerobiose. Obtêm energia a partir de aminoácidos ou glícidos e são geralmente halotolerantes (Collins *et al.*, 2004).

Na produção de enchidos fermentados, nomeadamente no que se refere à formação de flavour e estabilização da cor, os CCN são de extrema importância dado à sua capacidade em converter aminoácidos e ácidos gordos em compostos aromáticos (Leroy *et al.*, 2006; Talon *et al.*, 2007; Gøtterup *et al.*, 2008; Ravyts *et al.*, 2012). Os CCN apresentam também atividade redutora de nitrato, o que torna atrativa a sua utilização em culturas de arranque mistas de BAL e CCN, pois os processos de formação e estabilização da cor característica dos produtos curados são mais bem controlados (Leroy *et al.*, 2006). Adicionalmente, como apresenta atividade catalásica, a degradação de peróxidos eventualmente formados contribui para prevenir a formação de colorações desagradáveis e processos demasiado extensos de oxidação lipídica (Garcia-Varona *et al.*, 2000).

Apesar de ao nível das indústrias de larga escala se utilizarem culturas de arranque, estas não são muito utilizadas na produção tradicional, sendo que nesta última os microrganismos se designam vulgarmente por “microbiota da casa”. Embora este tipo de microflora se encontre presente nos produtos finais, a sua origem ainda é pouco conhecida nomeadamente no que se refere ao ambiente fabril acerca do género *Staphylococcus* e da sua persistência nestes ambientes (Talon *et al.*, 2007; Leroy *et al.*, 2010).

2.5 Efeitos das BAL no controlo da microflora patogénica

Nos últimos anos tem vindo a aumentar o interesse na preservação biológica dos alimentos, pelo que os microrganismos antagónicos e os seus metabolitos antimicrobianos, podem ser utilizados como potenciais conservantes naturais, pela sua capacidade em inativar os microrganismos indesejáveis nos alimentos, deteriorativos ou patogénicos (Annou *et al.*, 2007; Gálvez *et al.*, 2010). O mecanismo de ação envolvido na inibição produzida pelas BAL, nem sempre é passível de ser individualizado, dado que existe uma complexa interação entre diferentes fenómenos para a produção de um efeito combinado. Entre os diferentes instrumentos de inibição de que esta microflora dispõe, e cuja intensidade relativa e ocorrência são condicionadas por determinantes genéticas e ambientais, destaca-se a elevada competição no meio específico do alimento fermentado, a produção de ácidos orgânicos, péptidos e proteínas com carácter antimicrobiano- bacteriocinas- assim, como a produção de peróxido, diacetilo ou outros compostos antimicrobianos (Lindgren *et al.*, 1990; Earnshaw, R.G., 1992; Mishra *et al.*, 1996).

2.5.1 Competição direta

Muito, dos microrganismos empregues em culturas de arranque têm a sua origem associada a produtos fermentados naturalmente, sendo frequente o seu isolamento e seleção a partir de um ecossistema semelhante ao que se objetiva a sua aplicação. A grande diversidade de características que essa microflora apresente, permite que se possam procurar, nesse reservatório natural, biótipos que correspondem às necessidades exigidas (Chamba *et al.*, 1994).

Como uma das propriedades fundamentais das culturas de arranque, destaca-se a sua capacidade em competir com a microflora presente na carne, colonizando esse ambiente e dominando a microflora existente nos produtos fermentados. Assim, as culturas de arranque são obrigadas a competir com a microbiota natural existente na matéria prima, sendo condicionadas pela taxa de crescimento do microrganismo nas condições prevalecentes no enchido, ou seja, em condições de anaerobiose, com elevadas concentrações de sal, baixas temperaturas e pH ácido (Cocconcelli e Fontana, 2008).

2.5.2 Produção de ácidos

A natureza do ácido presente no meio afeta a resistência dos microrganismos face à acidificação. O efeito inibitório específico para os ácidos orgânicos é geralmente atribuído à sua forma não dissociada. O aumento da concentração destes ácidos de carácter lipofílico, nomeadamente o ácido láctico, determina um efeito antimicrobiano, que pode ter por base a redução do pH do meio, embora se considere que a sua ação se deve fundamentalmente à sua capacidade de na forma não dissociada atravessar a membrana celular, dissociando-se no seu interior com a consequente redução do pH intracelular (Kandler, 1983). O ácido acético classifica-se como um ácido fortemente inibitório para muitos microrganismos, assim, como quando o ácido acético e láctico simultaneamente (Rubin, 1978).

Uma vez que a maioria dos microrganismos indesejáveis presentes no alimento necessita de manter um pH intracelular dentro de limites estreitos para prevenir danos ao nível das estruturas proteicas, enzimas, ácidos nucleicos e fosfolipídios, a célula bombeia para o exterior o excesso de prótons gerados, à custa de consumo de ATP, cuja depleção pode ter consequências ao nível da manutenção de funções vitais na célula. Podem também ser operadas modificações na permeabilidade da célula, por uma eventual interferência com as proteínas membranares responsáveis pelo transporte ativo de nutrientes, com consequências ao nível da capacidade para produzir ATP (Baird-Parker, 1983; Davidson, 1997), ou manifestar-se um efeito tóxico resultante da dissociação, entretanto acumulada no interior da célula (Russel, 1992). Neste meio, desfavorável a um grande número de microrganismos, a resistência das BAL é fundamental, pois assegura a continuidade da sua atividade e incrementa a sua competitividade no meio, sendo determinada pela sua capacidade para suportar valores de pH intracelular consideravelmente mais reduzidos que o habitual noutras bactérias (Siegumfeldt *et al.*, 1993).

2.5.3 Produção de peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio pode ser produzido pelas BAL na presença de oxigénio, a partir da ação oxidante das flavoproteínas ou das NADH peroxidases. O potencial do peróxido de hidrogénio produzido pelas BAL ao nível da conservação alimentar é um pouco limitado, dado a sua complexidade em controlar a disponibilidade de oxigénio e a presença de níveis de superóxido dismutase e catalase diversificados. A natureza oxidativa do peróxido de hidrogénio e os seus radicais livres têm efeitos na qualidade sensorial do produto, pois são estes os responsáveis pela rancificação da gordura, assim como por reações de descoloração (Simonetti *et al.*, 1982).

2.5.4 Outros compostos não péptidicos

Algumas BAL, em condições específicas produzem compostos que podem desempenhar uma importante função antimicrobiana. De entre esses, destaca-se o diacetilo, devido ao seu elevado potencial no controlo de microrganismos indesejáveis, nomeadamente *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium* (Kang e Fung, 1999). A formação de diacetilo (2,3-butanodiona) interfere também no aroma dos produtos fermentados, tendo este composto um reduzido limiar de deteção a nível olfativo e conferindo aroma a manteiga o que pode ser depreciativo quando excessivo. A presença de diacetilo em enchidos foi relacionada com *L. plantarum* e com algumas espécies de *Staphylococcus* envolvidas na maturação de produtos cárneos, referindo-se que podem produzir quantidades consideráveis deste composto (Ramon *et al.*, 1992).

2.5.5 Bacteriocinas

As bacteriocinas definem-se como um grupo heterogéneo de compostos peptídicos com propriedades antibacterianas, que variam quanto ao espectro de atividade, modo de ação, peso molecular, propriedades bioquímicas e à sua origem genética (Ray e Daeschel, 1992). Estas são péptidos antimicrobianos de síntese ribossomal que não são letais para as células produtoras (Montville e Kaiser, 1993), sendo produzidas por muitas espécies de bactérias diferentes, das quais se destacam as bactérias do ácido láctico – BAL (citado por: L.O’Sullivan *et al.*, 2002).

No entanto, a produção de bacteriocinas encontra-se amplamente distribuída entre as BAL em associação com fermentações alimentares (Nettles e Barefoot, 1993; Jack *et al.*, 1995).

A utilização de bacteriocinas purificadas, do organismo que as produz ou de ambos é atraente para a indústria alimentar, porque considera tanto a procura crescente dos consumidores por produtos naturais como a crescente preocupação com doenças transmitidas por via dos alimentos (Montville e Winkowski, 1997). Estas se referem a compostos peptídicos ativos biologicamente, encontradas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que na maioria das vezes são codificadas por plasmídeos, além de serem encontradas em numerosas e variadas formas, nos mais diversos tamanhos, mecanismos de imunidade e ação (Riley e Wertz, 2002). Contudo, em todos os casos, a célula produtora da bacteriocina apresenta imunidade específica para a ação da sua própria bacteriocina (Montville *et al.*, 1995). Tal facto pode ser comprovado uma vez que algumas bacteriocinas produzidas à escala industrial, como a nisina, inibem não apenas as espécies relacionadas, como também são eficazes contra microrganismos patogénicos de origem alimentar, como *Listeria monocytogenes* e muitos outros microrganismos Gram-positivos de deterioração. Daí existirem bacteriocinas com interesse considerável no uso como conservante natural dos alimentos, o que levou à descoberta nos últimos anos de um crescente “arsenal” quanto ao potencial dessas proteínas inibidoras. Assim, as bacteriocinas exercem uma atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, que incluem a deterioração dos alimentos por bactérias patogénicas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Bacillus* spp. (Casaus *et al* 1997; Cintas *et al* 2001; Moreno *et al.* 2006; Nes *et al.* 2007; Line *et al.* 2008; Poeta *et al.* 2008).

Ainda que as bacteriocinas produzidas por BAL sejam habitualmente associadas à inibição de bactérias Gram positivas, há evidências experimentais de que existem bacteriocinas ativas contra bactérias Gram negativas, e de entre essas, com interesse na conservação e segurança sanitária de produtos cárneos. Messi *et al.* (2001) demonstraram a eficácia da plantaricina 35d contra *Aeromonas hydrophyla*.

Em 2005 Abriouel *et al* (2005) e Todorov *et al.* (2005) revelaram a ação de enterocina e de uma plantaricina, respectivamente, sobre várias bactérias Gram negativas, nomeadamente *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. , *Shigella sonnei* e *Pseudomonas aeruginosa*. Mais recentemente, Gong *et al.* (2010) evidenciaram a

atividade da plantaricina MG contra *Salmonella* spp. e *E. coli*, que são dois microrganismos patogênicos que causam elevada preocupação na indústria de produtos cárneos. Mills *et al.* (2011) apontam que a eficácia das bacteriocinas contra as bactérias Gram-negativas pode ser melhorada se a membrana exterior da célula for desestabilizada por qualquer outro fator conservante do meio, como a presença de agentes quelantes. Esses agentes, ao imobilizarem o íon Mg^{2+} do lipopolissacárido da parte exterior da membrana, vão levar à sua ruptura, resultando numa célula muito sensível às bacteriocinas (Deegan *et al.* 2006).

2.6 Importância da utilização de bacteriocinas em produtos cárneos

2.6.1 Tipo de bacteriocinas

O interesse pela investigação de bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas ocorreu no ano de 1947, a partir do qual se verificou que parte da atividade inibitória de *Lactococcus* é derivada a uma molécula caracterizada como um composto antimicrobiano proteico, denominado por substância do grupo “N inibidor” ou por nisina (Mattick *et al.*, 1947, citado por Riley e Chavan,. 2007). Esta substância, aprovada como aditivo alimentar em cerca de 50 países, lidera o campo das bacteriocinas, não só pelo conhecimento das suas características químicas e genéticas, mas também devido à sua ampla aplicação na indústria alimentar. Posteriormente em 1976 procedeu-se à primeira revisão ao nível do estudo de bacteriocinas de Gram-positivas, no qual se previu o crescente interesse da nisina quanto à sua aplicação na preservação de alimentos (Tagg *et al.*, 1976).

De forma a classificar as bacteriocinas, inicialmente em 1993 Klaenhammer (1993) propôs que as bacteriocinas de bactérias do ácido láctico se classificavam em quatro classes distintas:

- Classe I: bacteriocinas modificadas pós-tradução- Lantibióticos;
- Classe II: pequenas bacteriocinas (< 10 kDa) estáveis ao calor;
- Classe III: bacteriocinas termolábeis (> 30 kDa);

- Classe IV: complexos de bacteriocinas compostos por hidratos de carbono ou lípidos, para além da proteína;

Apesar da sua heterogeneidade físico-química, as bacteriocinas de BAL possuem características comuns, que mais tarde, com base em estudos científicos nos permitiram a classificação em apenas três classes (Nes *et al.*, 1996; Moll *et al.*, 1999). Por conseguinte esta classificação foi revista e atualmente as bacteriocinas são classificadas da seguinte forma (Todorov, 2009):

Classe I: Lantibióticos

O termo lantibiótico refere-se à matriz de péptidos antimicrobianos que na sua constituição apresentam lantionina. Esta classe pode ser dividida em duas subclasses- Lantibióticos tipo A e tipo B.

Nesta classe inserem-se pequenos peptídeos (< 5 kDa) policíclicos, que são ativos na membrana da célula alvo, que por vezes contém aminoácidos modificados pós-tradução como a lantionina (Lan), β- metil-lantionina (MeLan) e resíduos desidratados (nisina, lactocina S). De todos os lantibióticos descritos atualmente, sabe-se que estes atuam predominantemente ao nível das bactérias Gram- positivas (Jung *et al.*, 1991), ou seja, todos os lantibióticos estudados são produzidos por bactérias Gram-positivas (Nes *et al.*, 1996; Cintas *et al.*, 2001; Klaenhammer, 1993).

Classe II: Não- Lantibióticos, bacteriocinas estáveis ao calor

Esta classe compreende um grupo heterogéneo de bacteriocinas. Contudo, apesar das suas diferenças quanto à estrutura primária, a maioria das bacteriocinas pertencentes a esta classe são pequenos peptídeos (< 10 kDa) estáveis ao calor que possuem na sua constituição um elevado teor de pequenos aminoácidos como a glicina. As bacteriocinas deste tipo são muito características devido à sua capacidade fortemente catiónica e à posse de domínios hidrofóbicos e hidrofílicos. Este grupo por sua vez divide-se em quatro subclasses:

- **Classe IIa:** trata-se da classe deste grupo mais estudada por possuir propriedades tecnológicas interessantes e dado a sua forte atividade antimicrobiana contra uma vasta gama de bactérias Gram- positivas, de entre as quais *Listeria*

monocytogenes. Esta característica impulsionou o seu uso como potenciais conservantes alimentares (Rodriguez *et al.*, 2002).

Geralmente podem ser conhecidas como *pediocin-like* e podem ser produzidas por uma grande variedade de BAL. Neste grupo, a pediocina PA-1 é a mais conhecida (Riley *et al.*, 2007; Cintas *et al.*, 2001).

- **Classe IIb:** Neste grupo inserem-se complexos formadores de poros constituídos por oligómeros de dois peptídeos proteicos diferentes, que dependem da sua complementaridade para que ocorra atividade, uma vez que o seu efeito combinado é muito maior quanto à sua atividade individual (Abbe *et al.*, 1995; Cintas *et al.*, 1998).

- **Classe IIc:** Esta classe é denominada como bacteriocinas “*sec- dependent*”. Relativamente a este grupo ainda não existe muita informação, pelo que estas se caracterizam quanto à sua formação, sendo que algumas das bacteriocinas são sintetizadas a partir de uma sequência N-terminal, devido ao facto de não possuírem uma dupla glicina (GG). Durante o seu processamento, os péptidos ativados por um grupo tiol requerem resíduos de cisteína, como por exemplo, a lactococcina B.

- **Classe IId:** Inclui todas as bacteriocinas que não apresentam os critérios estabelecidos pelas primeiras secções da Classe II acima descritas (Todorov, 2009).

- **Classe III: Bacteriocinas termolábeis**

Nesta classe, incluem-se todas as bacteriocinas com elevado peso molecular (> 30 kDa). Estas estão inseridas dentro dos géneros *Lactobacillus* e *Enterococcus*, ao contrário da classe I e II das bacteriocinas, as da classe III são inativadas a elevadas temperaturas (Klaenhammer, 1993). As bacteriocinas desta classe dividem-se em bacteriocinas não líticas e em enzimas bacteriolíticas (Riley *et al.*, 2007).

- **Classe IV: Bacteriocinas cíclicas**

A classe IV das bacteriocinas inclui peptídeos inibitórios circulares, cujo principal modelo é a enterocina AS-48 (Heng *et al.*, 2007). Este grupo de bacteriocinas são peptídeos ribossomais circulares, processados após tradução, no qual o primeiro e o último aminoácido estão ligados covalentemente (Maqueda *et al.*, 2004).

2.6.2 Utilização de bacteriocinas em produtos cárneos

Têm sido realizados diversos trabalhos de investigação em que a atividade antagonista de bactérias do ácido lático tem sido estudada. No quadro 2.2 sintetiza-se a informação de alguns autores que identificaram bacteriocinas produzidas por BAL com interesse em produtos cárneos, nomeadamente *L. sakei* e *L. plantarum*.

Quadro 2.2. Exemplos de bacteriocinas produzidas por BAL com interesse no fabrico de produtos cárneos.

Bacteriocina	Produtor	Referência
<i>L. sakei</i>		
sakacina G	<i>L. sakei</i> 2512	Simon <i>et al.</i> , 2002
sakacina A	<i>L. sakei</i> Lb 706	Schillinguer e Lucke, 1989
sakacina P	<i>L. sakei</i> Lb 790	Aasen <i>et al.</i> , 2003
sakacina 1	<i>L. sakei</i>	Alves <i>et al.</i> , 2006
<i>L. plantarum</i>		
plantaricina UG1	<i>L. plantarum</i> UG1	Enan <i>et al.</i> , 1996
plantacina 154	<i>L. plantarum</i> LTF 154	Kanatani <i>et al.</i> , 1994
plantaricina SA6	<i>L. plantarum</i> SA6	Rekhif <i>et al.</i> , 1995

Nos trabalhos referenciados no quadro 2.2 são apontadas diferentes abordagens metodológicas no estudo da atividade antagonista. Assim, numa primeira fase, os autores estabelecem a capacidade para inibir microrganismos sensíveis, quer sejam microrganismos patogénicos ou outras espécies de BAL, por técnicas fenotípicas que incluem certas variações metodológicas, desde o teste de gota em agar à difusão em poços. Ainda no domínio fenotípico os autores que estudam a atividade antagonista efetuaram o despiste de outros fatores inibidores produzidos pelas BAL (ácidos, H₂O₂) para confirmar que a ação inibitória se devia a um potencial bacteriocina. Estes estudaram a sua natureza proteica ou peptídica decorrendo à deteção de atividade após ação do calor e de enzimas proteolíticas. Após deteção da atividade antagonista dos microrganismos, alguns autores determinaram as condições óptimas, por um lado

quanto à produção de bacteriocina e por outro quanto à sua ação. A identificação dos genes responsáveis pela produção de bacteriocinas, baseada em técnicas de PCR, tem sido atualmente utilizada por vários autores para confirmar que os microrganismos dispõem das ferramentas necessárias para produzir algumas das bacteriocinas atualmente bem caracterizadas, como é o caso dos *L. sakei* e de *L. plantarum*.

De entre as bactérias testadas como sensíveis, há um destaque claro para a *Listeria monocytogenes* na formulação dos objetivos dos trabalhos que têm sido publicados acerca desta temática. Sendo *Listeria monocytogenes* uma bactéria difícil de controlar a partir dos parâmetros habitualmente usados para inibir a microflora patogénica de produtos cárneos, nomeadamente pela sua reduzida a_w , que compreende valores entre 0,79 a 0,86, para os quais o efeito letal não foi observado (Doyle, 1990). Os valores da a_w para o crescimento de *Listeria monocytogenes* tem um limite mínimo para o crescimento de aproximadamente 0,92 (Wallace, 2001). Por outro lado, o carácter psicotrófico deste microrganismo pode contribuir também para a dificuldade em controlá-lo. Já o seu carácter ubiqüitário leva a que tenha que ser sempre considerada a possibilidade deste microrganismo estar presente ora na matéria prima, ora nas indústrias com falhas ao nível das práticas de higienização no ambiente fabril.

Adicionalmente, uma vez que *Listeria monocytogenes* se encontram taxonómicamente próxima das BAL, esta responde muito bem ao efeito inibitório das bacteriocinas. Sendo consensual que as BAL possuem uma atividade antagonista importante, nomeadamente contra a *Listeria* a sua avaliação exclusivamente “in vitro” recorrendo ao meio de cultura como substrato de despiste dessa atividade, deixa dúvidas quanto à sua potencial eficácia quando usada em condições reais de fabrico de produtos cárneos, em que há muitas variáveis próprias do ecossistema microbiano que não são tão controladas como nos ensaios laboratoriais, tais como, a composição das matérias ou ingredientes usados, microflora natural das matérias primas, ciclos de temperatura, uso ou não de técnicas de fumagem, entre outros fatores.

De forma a dar resposta a essa dificuldade de extrapolação da atividade antagonista de ensaios in vitro para a realidade do fabrico de produtos cárneos, alguns autores têm tentado fazer essa ligação, testando a eficácia do antagonismo/bacteriocina em condições reais de fabrico. Nos quadros 2.3, 2.4 e 2.5, encontram-se alguns exemplos de bacteriocinas produzidas por espécies de *L. sakei*, *L. plantarum* e *L. curvatus*, e em carnes e produtos cárneos, respetivamente.

Quadro 2.3. Bacteriocinas produzidas por *L. sakei* utilizadas em carnes e produtos cárneos

Bacteriocina	Origem do microrganismo produtor	Microrganismo sensível	Referência
Sakacina P	Carne	<i>L. monocytogenes</i> <i>E. faecalis</i>	Tichaczek <i>et al.</i> , 1992
Sakacina P	Frango	<i>L. monocytogenes</i>	Aasen <i>et al.</i> , 2000
	Bacon		
	Presunto	<i>L. monocytogenes</i>	Martinis <i>et al.</i> , 2003
	Linguiça		
	Mortadela		
Sakacina 1	Presunto	<i>L. monocytogenes</i>	Alves <i>et al.</i> , 2006
Sakacina P	Enchidos	<i>L. monocytogenes</i>	Urso <i>et al.</i> , 2006
Sakacina G	Carne de aves	<i>L. monocytogenes</i>	Dortu <i>et al.</i> , 2008
Sakacina P	Carne bovina		
Sakacina A	Bovino fresco	<i>L. monocytogenes</i>	
	Carne bovina e suína processadas	<i>B. thermophacta</i>	Jones <i>et al.</i> , 2008
	Presunto	<i>C. jejuni</i> <i>Cl. estertheticum</i>	
Não mencionada pelo autor	Salpicão	<i>B. thermophacta</i>	Castro <i>et al.</i> , 2011
Sakacina	Presunto	<i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i> O157:H7 <i>S. aureus</i>	Slavica <i>et al.</i> , 2010
Sakacina A	Bovino picado	<i>L. monocytogenes</i>	Hartmann <i>et al.</i> , 2011
Sakacina X			
Sakacina G1	Salpicão	<i>Enterococcus</i> spp.	
Sakacina G2		<i>Listeria</i> spp. <i>E. coli</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	Todorov <i>et al.</i> , 2013

Quadro 2.4 Bacteriocinas produzidas por *L. plantarum* utilizadas em carnes e produtos cárneos

Bacteriocina	Origem do microrganismo produtor	Microrganismo sensível	Referência
Plantaricina LP84	Coleção de Laboratório de Química Nacional na Índia	Gram- positivas Gram-negativas	Suma <i>et al.</i> , 1998
	Carne Salgada	<i>S. arizonae</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeuroginosa</i> <i>E. coli</i>	Essid <i>et al.</i> , 2009
bac ST202Ch	Chouriço	Gram-positivas	Todorov <i>et al.</i> , 2010
bac ST216Ch	Beloura	Gram-negativas	

Quadro 2.5 Bacteriocina produzidas por *L. curvatus* utilizadas em carnes e produtos cárneos

Bacteriocina	Origem do microrganismo produtor	Microrganismo sensível	Referência
Curvacina A	Enchidos	<i>E. coli</i> <i>Carnobacterium</i> <i>Leuconostoc</i> spp.	Tchikazec <i>et al.</i> , 1992
Curvacina A	Enchidos fermentados	<i>L. innocua</i>	Verluyten <i>et al.</i> , 2004
Curvacina A	Enchidos fermentados	<i>L. monocytogenes</i>	Cocolin <i>et al.</i> , 2007
Lactocina 705	Enchidos Argentinos	<i>L. monocytogenes</i> <i>B. thermosphata</i>	Castellano <i>et al.</i> , 2008
	Salpicão	<i>L. innocua</i> <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeuroginosa</i>	Castro <i>et al.</i> , 2011

Para além dos exemplos referidos nos quadros 2.3, 2.4 e 2.5, há vários estudos envolvendo bactérias do ácido láctico como probióticas, principalmente em alimentos fermentados, e esses microrganismos demonstram a sua capacidade de sobreviver no organismo do Homem (Mombelli e Gismondo, 2000). Dos estudos efetuados com bacteriocinas do género *Enterococcus*, apesar de na literatura não existir muita informação quanto a este género, damos especial destaque a Abriouel *et al.*, 2003; Abrams *et al.*, 2011; Laukeóva *et al.*, 2004; Maneková *et al.*, 2006; Sabia *et al.*, 2003; Sparo *et al.*, 2008; e Turgis *et al.*, 2012. Os microrganismos pertencentes ao género *Enterococos* são encontrados numa grande variedade de ambientes, tal como na água ou no solo. Estas bactérias fazem parte da microbiota autóctone do trato gastrointestinal do Homem e de diferentes animais de sangue quente (Murray, 1990; Klein, 2003). Frequentemente, são encontradas em alimentos fermentados, como produtos lácteos e carnes (Franz *et al.*, 1994; Hugas *et al.*, 2003). Dentro deste género, os mais referenciados são *E. faecium* e *E. faecalis*.

3. Material e Métodos

3.1. Desenho experimental

O presente trabalho desenvolveu-se em várias etapas, conforme esquematizado na figura 3.1. Num primeiro momento procedeu-se à pesquisa de atividade antagonista produzida por *L. sakei* e *L. plantarum* previamente isolados de enchidos tradicionais e identificados fenotipicamente. A identidade dos microrganismos em estudo foi confirmada por PCR específica de espécie.

Dado o número considerável de estratégias de detecção de antagonismo publicadas, compararam-se alguns métodos de detecção no sentido de avaliar sobre a sua facilidade de emprego e capacidade de detecção de antagonismo. Selecionou-se um método direto diferido de gota em agar para o primeiro despiste, e um método de difusão em poços para despiste da produção de BLIS (Bacteriocin Like Inhibitory Substances) a partir de sobrenadante da cultura produtora neutralizado, tratado com catalase e esterilizado por filtração. Procedeu-se então ao despiste com o grupo de 17 BAL isoladas de enchidos e estirpes de referência contra várias estirpes de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli*. Face à sua atividade, selecionaram-se três estirpes de *L. sakei* para estudar o efeito de condições de fabrico de chouriço na produção e ação do antagonismo contra *L. monocytogenes*, nomeadamente a temperatura de incubação da cultura, o pH e o teor em sal do meio de cultura na produção de BLIS, e a ação do vinho na ação/detecção desse antagonismo. Por fim, estudou-se a eficácia da utilização de *L. sakei* em condições próximas das do fabrico de enchidos, usando uma preparação de carne picada com uma formulação semelhante à de chouriço. A eficácia de *L. sakei* foi testada conjuntamente com a ação do vinho comumente usado para temperar esse enchido, e a da adição de glícidos fermentáveis no controlo de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.. O ensaio decorreu somente em massa de chouriço, para evitar o eventual encobrimento dos efeitos pela ação da fumagem e da secagem.

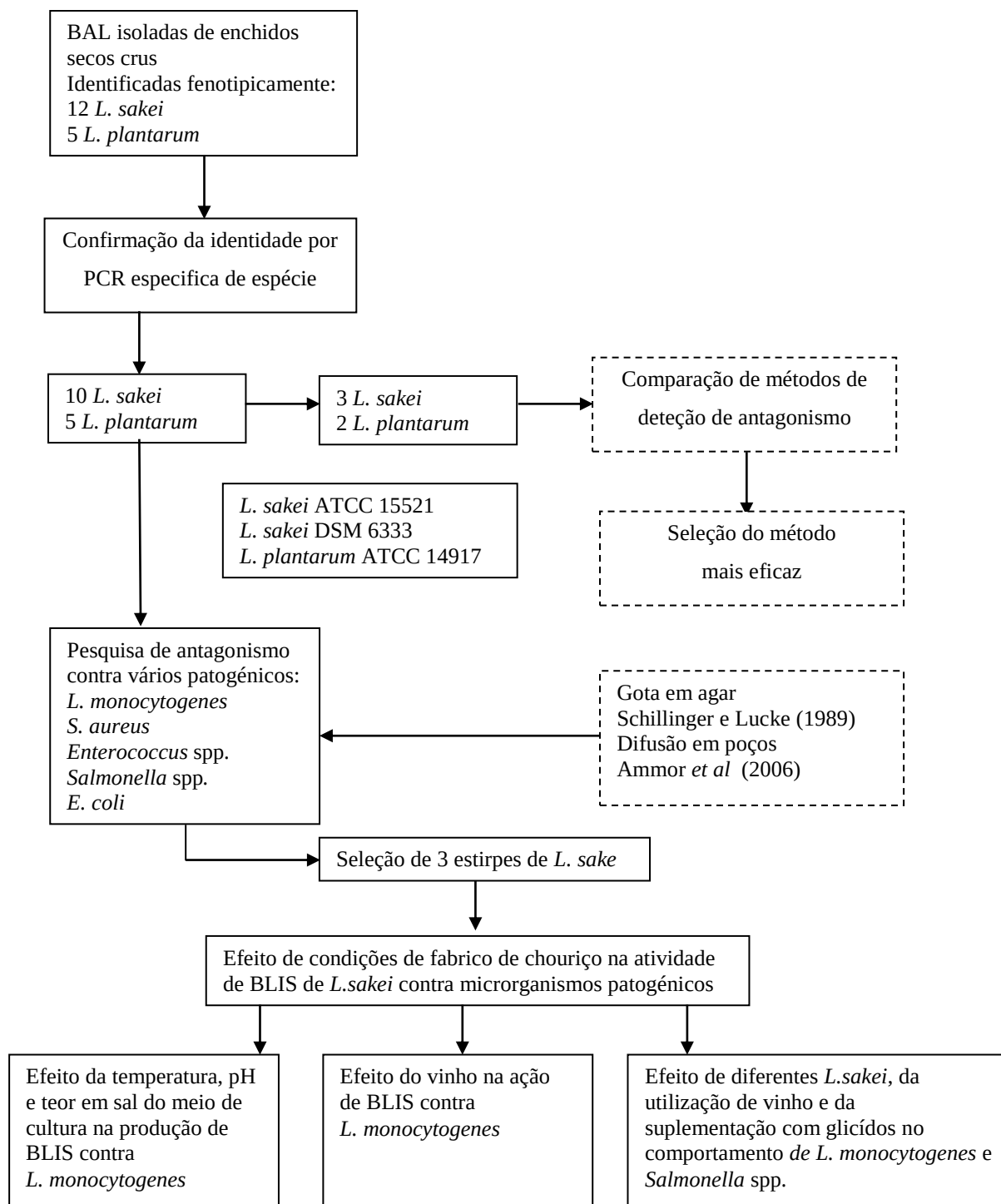


Figura 3.1. Esquema geral do trabalho experimental

3.2. Microrganismos e condições de cultura

3.2.1. Bactérias do ácido láctico

3.2.1.1. Microrganismos e condições de cultura

As pesquisas foram efetuadas com 14 estirpes de *Lactobacillus* (*L. sakei* e *L. plantarum*) isoladas de enchidos tradicionais da região de Trás-os-Montes, identificadas fenotipicamente por Patarata (2002) (quadro 3.1) e duas estirpes *L. sakei* de coleções de culturas (ATCC 15521 e DSM 6333). As culturas estavam conservadas a -20°C em MRS líquido (Biokar 089) e suplementadas com 15% de glicerol. Anteriormente à sua utilização, as culturas conservadas foram repicadas duas vezes em MRS líquido e a sua pureza confirmada por cultura em placa. Para inocular os meios de cultura específicos das várias propriedades em estudo utilizou-se uma suspensão de microrganismos em solução de cloreto de sódio (0,85%). Este foi obtida a partir do crescimento em 30 ml de MRS líquido a 30°C durante 16 a 24h, e posteriormente centrifugada (2500 x g, 20 minutos) e o sedimento foi lavado com solução de NaCl 0,85%. Seguidamente, a densidade da suspensão celular foi aferida a cerca de 10⁸ microrganismos por ml por comparação à escala de McFarland 0,5 ((Biomérieux 70900).

Quadro 3.1. Bactérias do ácido láctico utilizadas na deteção de atividade antagonista

Microorganismo	Estirpe	Origem
<i>L. sakei</i>	ATCC 15521	American Type Culture Collection
	DSM 6333	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
	Ls-Ch-1284	Chouriço em diferentes fases de fabrico
	Ls-Ch-1305 ⁽¹⁾	
	Ls-Ch-1320 ⁽¹⁾	
	Ls-Ch-1340 ⁽¹⁾	
	Ls-Ch-1343	
	Ls-Ch-1345	
	Ls-Ch-1358	
	Ls-Ch-1376	
	Ls-Ch-1381	
	Ls-Ch-1382;	
<i>L. plantarum</i>	ATCC 14917	American Type Culture Collection
	Lp-Ch-5 ⁽¹⁾	Chouriço em diferentes fases de fabrico
	Lp-Ch-70 ⁽¹⁾	
	Lp-Ch-702	
	Lp-Ch-725	

(1) Nos testes laboratoriais indicados foram usados somente estes microrganismos

3.2.1.2 Confirmação da identidade de *L. sakei* e *L. plantarum* por PCR específica de espécie

A confirmação de identidade partiu de um grupo de 16 estirpes, 12 de *L. sakei* e 4 de *L. plantarum* previamente identificadas fenotipicamente. Essas estirpes são as 14 indicadas no quadro 3.1 mais duas de *L. sakei* que se verificou que não pertenciam a espécie, pelo que não se indicaram no referido quadro.

A extração do DNA genómico foi realizada a partir de uma cultura de 16-18 h em 10 ml MRS com o conjunto de reagentes e colunas de extração *NZY Tissue gDNA Isolation kit* (NZYTech MB135). O DNA isolado foi mantido em refrigeração até utilização. As reações de PCR foram preparadas de acordo com Berthier e Ehrlich (1998). Apresenta-se no quadro 3.2. a sequência dos *primers* utilizados (Invitrogen Life Technologies). As reações de amplificação (quadro 3.3) foram preparadas num termociclador Biorad, de acordo com as condições indicadas no quadro 3.4.. A electroforese foi realizada em gel de agarose a 1,5% com $1,5 \times 10^{-3}\%$ de brometo de etídio. Seguidamente observou-se o gel sob iluminação UV para detecção dos amplicões (quadro 3.2) por comparação com um marcador com bandas de 50 to 1500 bp NZYDNA Ladder VI (NZYTech MB089)

Quadro 3.2. Sequência dos *primers* utilizados na reacção de PCR.(adaptado de Berthier e Ehrlich, 1998)

Espécie	Primers	Sequência (5'-3')	Amplicação (pb)
<i>L. sakei</i>	Ls	ATGAAACTATTAAATTGGTAC	290
	16S	GCTGGATCACCTCCTTTC	
<i>L. plantarum</i>	Lp	ATGAGGTATTCAACTTATG	265
	16S	GCTGGATCACCTCCTTTC	

Quadro 3.3. Concentrações utilizadas nas reações de PCR para detecção de *L. sakei* e *L. plantarum* (adaptado de Berthier e Ehrlich, 1998)

Reagente	Concentração na reação
Tampão de PCR 10X	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,5 mM
dNTP'S (25 mM)	250 µM cada
Primers:	
16S (50 µM)	0,3 µM
Ls ou Lp (50 µM)	0,3 µM
Taq DNA Polimerase	1 U
DNA	±1 µg/ml

Quadro 3.4. Condições de amplificação dos fragmentos de DNA (adaptado de Berthier e Ehrlich, 1998)

Etapa	<i>L. sakei</i>		<i>L. plantarum</i>	
	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Desnaturação inicial	5	94	5	94
<i>Nº de Ciclos</i>	<i>20</i>		<i>30</i>	
Desnaturação	1	94	1	94
Hibridação	1	45	1	50
Extensão	1	72	1	72
Extensão final	5	74	5	72
Arrefecimento		4		4

3.2.2. Bactérias patogênicas testadas como microrganismo sensível

Das culturas de microrganismos a testar como sensíveis, para cada espécie incluiu-se uma estirpe de referência e estirpes previamente isoladas de produtos cárneos ou do seu ambiente de produção por Patarata *et al* (2005), Martins (2010) e Talon *et al* (2012). Esses microrganismos estão indicados no quadro 3.5 O procedimento para a reativação das bactérias patogênicas foi similar ao indicado para as BAL, no qual se introduziram alterações, substituindo o meio de cultura líquido e sólido por BHI (Oxoid CM225), e adotou-se a temperatura de incubação a cada um dos microrganismos em estudo, sendo de 30°C (*Listeria monocytogenes*), 37°C (*E. coli*, *Salmonella* spp e *S. aureus* e *Enterococcus* spp.) durante 24h.

Quadro 3.5. Bactérias utilizadas como sensíveis na detecção de atividade antagonista

Microorganismo	Estirpe	Origem
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 35152	American Type Culture Collection
	EDS-B-LM02	Massa de chouriço
	MPI-SaSk-LM05	Salpicão após fumagem
	JI-Me-LM03	Carne utilizada na preparação de produtos cárneos
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	American Type Culture Collection
	AI-Me-SA11	Carne utilizada na preparação de produtos cárneos
	EDS-ChM-SA01	Chouriço no meio do processo de secagem
	EDS-E-SA02	Ambiente de preparação dos enchidos
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>E. faecium</i> DSM 20477	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
	EDS-Ch-EN01, EDS-Ch-EN44	Chouriço
<i>Salmonella</i> spp.	ATCC 49214	American Type Culture Collection
	MPI-B-S07	Massa de chouriço
	MPI-Mo-S63	Moura (processo de secagem)
	JI-Ca-S63	Tripa de porco natural após preparo para enchimento
	MPI-E-S92	Ambiente de preparação dos enchidos
<i>E.coli</i>	ATCC 35150	American Type Culture Collection
	MPI-B-EC01	Massa de chouriço

3.3. Despiste da produção de antagonismo de BAL

3.3.1. Comparação de métodos de despiste

Dada a existência de uma variedade considerável de métodos com o intuito de detetar atividade antagonista, num primeiro momento do presente trabalho experimentaram-se alguns métodos publicados, no sentido de avaliar a sua facilidade de execução e clareza dos resultados obtidos. No quadro 3.6 sintetizam-se as principais etapas dos métodos. Nesta comparação utilizaram-se somente as quatro estirpes de *L. monocytogens* como sensível e cinco estirpes de BAL indicadas no quadro 3.1.

Quadro 3.6. Métodos para despiste da produção de antagonismo utilizados para comparação

Método	<i>Schillinger e Lucke (1989)</i>	<i>Ammor et al (2006)</i>	<i>Toba et al (1991)</i>	<i>Tagg et al (1971)</i>
Meio de cultura	MRS	BHI	BHI	MRS
Técnica	Gota em agar; Difusão em poços	Difusão em poços de agar	Difusão em microplacas	Difusão em poços
Descrição	Depositar 10 µl de suspensão celular na superfície de uma placa de MRS; Verter 7 ml de BHI contaminado sobre a placa e incubar. Dividir o SN em três partes, neutralizar, inocular suspensão celular e incubar.	Em placas de agar com poços, sobrepor 15 ml de BHI agar fundido inoculado com 100 µl da suspensão celular; Incubar a 30°C, 24h.	Nos poços adicionar: 70 µl BHI soft + 15 µl SN esterilizado + 30 µl de BHI + 100 µl BHI contaminado. O autor distingue vários métodos, sendo que para bactérias aeróbias- II e VII. Em II usa-se 70 µl MRS soft + 50 µl SN esterilizado + 30 µl de MRS agar + 100 µl indicador; no VII 120 µl MRS soft +30 µl de MRS agar +colónia teste, incubar 24h a 37 °C em jarra de anaerobiose, adicionar 100 µl indicador, voltar a incubar 24h em aerobiose.	Numa placa com poços, selar a base com uma gota de agar nutritivo; Adicionar 30 µl de suspensão celular, incubar até difusão total (37°C, 1-2h); Inverter o agar para a tampa e inocular com 100µl da bactéria sensível. Incubar a 37°C durante 24h.
Observações	Rápido Moroso Mais usado	Rápido	Moroso Sensível	Rápido Simples

3.3.2. Despiste de antagonismo

Método direto diferido de gota em agar

A pesquisa da atividade antagonista dos isolados de *L. sakei* e *L. plantarum* (quadro 3.1) foi realizada de acordo com Schillinguer e Lucke (1986). Como bactérias sensíveis utilizaram-se as referenciadas no quadro 3.5..

Inicialmente, procedeu-se à realização de um teste de gota em agar com todos os isolados a testar como produtores. As culturas de BAL com 18h de incubação em MRS foram centrifugadas (2500 x g, 15 min), lavadas duas vezes com NaCl 0.85% e suspensas a uma concentração final similar. A partir da suspensão inicial com turvação similar ao padrão McFarland 0.5 prepararam-se as diluições necessárias em NaCl 0,85%, de forma a obter um nível de inoculação de cerca de 6 log ufc/ml. Depositou-se 20 µl de suspensão celular, sob a forma de gota na superfície de uma placa de MRS agar com 0.2% de glucose (MRS 0.2), no sentido de minimizar o efeito da acidez, e incubados a 30 em condições de anaerobiose, de forma a evitar a formação de peróxido de hidrogénio.

As culturas de microrganismos a testar como sensíveis cresceram em BHI durante 24h à temperatura adequada a cada microrganismo, a seguir foram centrifugadas (2500 x g, 15 min), lavadas duas vezes com NaCl 0.85 % e suspensas a uma concentração final similar (McFarland 0.5). A partir, das suspensões celulares das culturas de microrganismos a testar como sensíveis inoculou-se 100 µl de suspensão celular em 7 ml de BHI suplementado com 0,7% de agar (BHI semi-sólido), previamente fundido e arrefecido à temperatura de sobre-fusão. O meio inoculado foi vertido sobre a caixa de Petri onde tinha ocorrido o crescimento da cultura a testar como produtora. Após incubação (30°C, 24 h, anaerobiose) pesquisou-se zonas de inibição. Os resultados foram considerados positivos quando se observou uma zona de inibição de, pelo menos, 1 mm.

Método de difusão em poços

A deteção de inibição produzida pelas BAL que tinham mostrado atividade antagónica no despiste direto diferido foi realizada pelo método descrito por Ammor *et al* (2006) e com as bactérias sensíveis que tinham sido inibidas. Este método é uma

adaptação do método de detecção de Schillinguer e Lucke (1986). A principal modificação introduzida pelos autores é a supressão do meio de cultura de suporte da detecção. Enquanto Schillinguer e Lucke (1986) inoculam a bactéria sensível em 7 ml de meio de cultura semi-sólido (0,7%) de agar e vertem-no numa placa já com 15 ml de meio de cultura gelosado normal, na variante do método adotada no presente trabalho, o único meio de cultura envolvido é o semi-sólido, numa quantidade maior. A eliminação da camada inferior de meio de cultura gelosado, ainda que torne a execução corrente do método mais difícil, pois a formação dos poços em meio semi-sólido é bastante mais trabalhosa, evita que haja a possibilidade de difusão do sobrenadante pelo meio de suporte, reduzindo a sua ação na camada superior onde está colocado o microrganismo a testar como sensível.

A preparação dos microrganismos sensíveis foi realizada como indicado no método de gota em agar, e foram inoculados 100 µl de suspensão celular em 15 ml de BHI suplementado com 0,9% de agar (BHI semi-sólido), previamente fundido e arrefecido à temperatura de sobrefusão. A concentração de agar foi aumentada em 0,2% em relação ao proposto pelos autores para conseguir formar poços estáveis. O meio de cultura já inoculado foi vertido em placas de petri com pontas de micropipetas azuis invertidas, imobilizadas em placas de poliestireno expandido, para a formação dos poços.

Na preparação da bactéria produtora utilizou-se o sobrenadante da BAL. O sobrenadante foi neutralizado até um pH final de $6,5 \pm 0,2$ com NaOH (1N; 0,1N) e esterilizado por filtração com filtros de 0,2 µm e tratado com catalase (1 mg/ml). Foi depositado em cada poço 70 µl de sobrenadante tratado e as placas repousaram na bancada durante 1 h para permitir a difusão antes de serem manipuladas. A incubação decorreu a 30°C durante 18 a 20h. Registou-se como positivo a ocorrência de zonas de inibição em redor do poço de, pelo menos 1 mm.

3.4. Efeito de condições de fabrico de chouriço na atividade de BLIS de *L. sakei* contra *Listeria monocytogenes*

3.4.1. Efeito da temperatura de crescimento, do pH e do teor em sal na produção de BLIS

No sentido de avaliar o efeito de alguns ingredientes e condições habitualmente utilizados no fabrico de enchidos na produção de BLIS, com três estirpes de *L. sakei* (indicadas no quadro 3.1 com ⁽¹⁾) avaliou-se a atividade antagonista do sobrenadante obtido do crescimento de culturas em MRS suplementado com 7.5% de vinho, 200 mg/l de nitrato de potássio e 200 mg/l de nitrito de sódio. Esta formulação de base foi utilizada para incluir alguns dos fatores envolvidos no fabrico de chouriço que podem condicionar a produção de compostos de carácter antagonista. Utilizou-se como fatores variáveis o teor em sal 2%,4% e 6%, o pH de 4,5 – 5,5 e 6,5 e a temperatura de incubação de 7°C, 15°C e 30°C. As culturas foram incubadas e a evolução do crescimento foi monitorizada por leitura espectrofotométrica da turvação a D.O. a 600 nm.

O sobrenadante das culturas foi recolhido às 24h, 48h e 5 dias das culturas incubadas a 30°C, 15°C e 7°C, respetivamente. Os sobrenadantes das culturas de BAL foram tratados como supra indicado no método de difusão em poços de Ammor *et al.* (2006) e a atividade antagonista foi pesquisada contra as quatro estirpes de *L. monocytogenes* indicadas no quadro 3.5, usando o mesmo método.

3.4.2. Efeito da adição de vinho na detecção da atividade de BLIS

Para estudar o efeito do vinho na ação inibitória de compostos eventualmente produzidos por três estirpes de *L. sakei* (indicadas no quadro 3.1 com ⁽¹⁾) as culturas foram preparadas em condições ótimas (MRS, 30°C, 24h) e o sobrenadante recolhido e preparado como indicado em 3.3.2. As quatro estirpes de *L. monocytogenes* foram preparadas também como indicado em 3.3.2. A detecção da atividade antagonista foi realizada usando o método previamente descrito de Ammor *et al.* (2006) mas suplementando o BHI semi-sólido com 7,5% de vinho tinto da região (pH 3,5; 12°). A comparação foi realizada com os resultados obtidos na fase de pesquisa com todas as BAL, usando como controlo sem utilização de vinho.

3.4.3. Efeito combinado da utilização de *L. sakei* produtores de BLIS, com vinho e glúcidos fermentáveis em massa de chouriço

A ação antagónica das BAL contra microrganismos patogénicos, nomeadamente contra *L. monocytogenes* pode estar associada a diferentes mecanismos. A pesquisa dessa atividade antagónica em meio de cultura, sendo útil para detetar estirpes mais eficazes e estudar as condições em que a inibição pode ser maximizada, tem sempre a limitação de ser efetuada em condições diferentes das reais, podendo haver fatores no fabrico do produto que venham a modificar o perfil de inibição. Assim, no sentido de avaliar a eficácia de 3 estirpes de *L. sakei* (Ls-Ch 1305, Ls-Ch 1340 e DSM 6333) na inibição de *L. monocytogenes* e de *Salmonella* spp. nas condições de fabrico de chouriço, delineou-se um ensaio em que se utilizaram como fatores variáveis a estirpe de *L. sakei* (as supra-indicadas e um controlo não inoculado) a utilização de vinho (ausente ou adicionado a 7,5%) e a presença de glúcidos fermentáveis (ausente ou adição 0.25% de glucose + 0.75% de lactose). O ensaio foi preparado com os ingredientes fixos; 2% de sal e 150 mg/kg de nitrito de sódio e 150 mg/kg de nitrato de potássio.

O chouriço não foi curado, tendo-se restringido ao comportamento dos microrganismos em estudo na massa. Esta estratégia foi seguida para isolar mais claramente os efeitos em estudo, pois a fumagem e a desidratação utilizadas no fabrico do chouriço têm um efeito inibitório assinalável, e o seu efeito poder-se-ia sobrepor aos efeitos em estudo. Assim, as preparações da massa de chouriço foram mantidas em sacos de polietileno fechados e incubados a 15°C (temperatura vulgarmente utilizada na secagem/maturação de enchidos, e analisados às 16h, 3 e 7 dias após preparação.

3.4.3.1. Preparação dos microrganismos a inocular

As estirpes de *L. sakei* selecionada para inocular no chouriço foram selecionadas do grupo de microrganismos produtores testados, com base na sua capacidade antagonista contra *L. monocytogenes*. A utilização da estirpe DSM 6333 foi determinada pelo facto de ser uma bactéria previamente estudada e ser produtora de sakacina A (esta estirpe corresponde à estirpe Lb706 estudada por Schillinguer e Lucke (1986)).

As estirpes de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. são as indicadas no quadro 4.5. Ainda que não se tenha detectado efeito inibitório de *L. sakei* contra *Salmonella*

spp., este microrganismo patogénico foi introduzido no ensaio no sentido de estudar o seu comportamento face aos outros fatores em estudo.

A preparação dos microrganismos a inocular foi realizada basicamente como indicado em 3.3.2. As estirpes de cada bactéria patogénica foram misturadas após a centrifugação (uma mistura para *L. monocytogenes* e outra para *Salmonella* spp.). As estirpes de *L. sakei* foram utilizadas isoladamente. A densidade das culturas foi aferida para, transferindo 10 ml de suspensão bacteriana, atingir uma contaminação da ordem de 7 log ufc/g de *L. sakei* e cerca de 5 log ufc/g de cada uma das bactérias patogénicas testadas.

3.4.3.2. Preparação da massa de chouriços

No fabrico dos chouriços foi utilizada carne da barriga de porco. A carne foi desossada e descouratada e picada numa picadora de discos, com um crivo de 15 mm. Foram preparados 32 sacos com 200 g de carne picada (4 níveis de *L. sakei* × 2 níveis de vinho × 2 níveis de glícidos × 2 microrganismos patogénicos). As amostras foram contaminadas com a mistura de *Listeria monocytogenes* ou *Salmonella* spp. e aguardaram cerca de 4 h a 4°C para permitir a adaptação do microrganismo ao ambiente para onde fora transferido. De seguida os ingredientes de base foram adicionados: sal (2%), nitrito de sódio e nitrato de potássio à concentração de 150 mg/kg de NaNO₂ e 150 mg/kg de KNO₃. As amostras foram depois organizadas de acordo com o desenho do ensaio e foram feitas todas as combinações possíveis entre a adição de *L. sakei* (controlo, Ls-Ch 1305, Ls-Ch 1340 e DSM 6333) vinho (ausente ou adicionado a 7,5%) e glícidos fermentáveis (ausente ou adição 0.25% de glucose + 0.75% de lactose). Os sacos fechados foram transferidos para uma câmara a 15°C onde permaneceram até aos 7 dias. Fizeram-se recolhas de 10g de amostra (em triplicado) às 16h, 3 e 7 dias de incubação.

3.4.3.3. Análises laboratoriais

No final de cada tempo, procedeu-se à colheita (em triplicado) de 10 g de amostra, a qual foi diluída a 1:10 com uma solução salina a 0,85%. A amostra foi homogeneizada num “stomacher” durante 90 segundos; para proceder às diferentes

determinações foram realizadas diluições decimais sucessivas em 9 ml da mesma solução.

Para a contagem de *Salmonella* spp. procedeu-se à inoculação, em superfície, das diluições pertinentes em XLD (Biokar 06608). Incubação a 37° durante 24 horas. Para contagem de *L. monocytogenes*, semeou-se 0,1 ml da mistura em meio Oxford Agar (Biokar BK110) com suplemento próprio (Biokar BS003), em superfície. As placas foram colocadas numa estufa a 30°C onde incubaram durante 24 h a 48h. A contagem de BAL foi realizada por incorporação de 1 ml das diluições pertinentes em MRS (Biokar BK089) previamente fundido e arrefecido à temperatura de sobre-fusão. Incubação a 30°C até 48h. Os resultados são expressos em log ufc/g.

O pH foi determinado e homogeneizado em 10g de amostra com 90 ml de NaCl 0,85% após realização das sementeiras do meios de culta, utilizando um medidor de pH Crison modelo micropH 2002.

3.5. Análise de dados

No ensaio em que se estudou o efeito da temperatura de crescimento, do pH e do teor em sal na produção de BLIS, a frequência da ocorrência de inibição de *L. monocytogenes* nas condições de ensaio estudadas foi estudada pelo teste do Qui-quadrado. Associação entre a ocorrência de inibição (BLIS) e a biomassa da cultura, para cada temperatura ensaiada, foi feita por análise de variância simples.

O contributo que cada efeito em estudo (temperatura de crescimento, do pH e do teor em sal e complementarmente a biomassa) foi estudado ainda por um modelo de regressão logística, no sentido de quantificar a contribuição de cada nível de cada variável em estudo para a ocorrência de inibição. No ensaio em que se estudou o efeito combinado da utilização de *L. sakei* produtores de BLIS, com vinho e glícidos fermentáveis em massa de chouriço, as contagens de BAL, de *L. monocytogenes* e de *Salmonella* spp. foram comparadas por análise de variância com interação para os fatores “*L. sakei*” e “vinho” separadamente para as amostras com e sem glícidos adicionados. A não introdução deste efeito na análise de variância fatorial deveu-se a elevada complexidade que resulta da análise de três fatores com interação. A localização de diferenças entre as médias foi realizada com o teste de Tukey. O tratamento de dados foi realizado com o programa IBM SPSS Statistics 20.0

4. Resultados e discussão

4.1 Confirmação da identidade de *L. sakei* e *L. plantarum* por PCR específica de espécie

A confirmação de identidade de BAL foi efetuada num grupo de 17 estirpes, 12 de *L. sakei* e 5 de *L. plantarum* previamente identificadas fenotipicamente por Patarata (2002). Essas estirpes são as 17 indicadas no quadro 3.1 mais duas de *L. sakei* que se verificou que não pertencia a espécie. Estas duas espécies são das mais frequentemente encontradas em enchidos fermentados (Montel *et al.*, 1989, Rebecchi *et al.*, 1998). A deteção de duas estirpes com fenótipo compatível com *L. sakei* que se revelaram não o ser é natural, uma vez que *L. sakei* é fenotipicamente muito próximo de *L. curvatus* (Nissen e Dainty, 1995).

4.2 Despiste da produção de antagonismo de BAL

4.2.1 Comparação de métodos de despiste

A comparação de vários métodos de despiste foi realizada com o intuito de seleccionar uma técnica de execução simples e com resultados claros. Os resultados das determinações efetuadas com três estirpes de *L. sakei* e duas de *L. plantarum* contra quatro estirpes de *Listeria monocytogenes* encontram-se apresentados no quadro 4.1. Apresentam-se somente os resultados obtidos com o sobrenadante neutralizado, esterilizado e tratado com catalase. O antagonismo direto detectado pelo método de gota em agar pelo método de Schillinger e Lucke (1989) foi positivo em todas as combinações testadas. Os métodos descritos por Toba *et al.*, (1991) revelaram-se pouco eficazes (resultados não apresentados). Ainda que as variações do método apresentadas por estes últimos autores se configurassem muito interessantes por permitir realizar um número elevado de testes com uma única placa de 96 poços, reduzindo os custos do despiste, este método revelou-se pouco prático, pois envolve a distribuição de meios de cultura gelosados por poços, o que não é prático de realizar, pois a solidificação durante a distribuição complica consideravelmente a execução do método.

Para além da dificuldade de execução, a deteção dos antagonismos revelou-se muito difícil, pois é muito pouco clara distinção de poços com e sem crescimento, quer usando antagonismo direto quer sobrenadante, decorrente da opacidade natural dos meios de cultura gelosados. A estratégia de utilização de métodos baseados em placas de 96 poços foi abandonada.

Quadro 4.1. Resultados da pesquisa de BLIS efetuada com três estirpes de *L. sakei* e duas de *L. plantarum* contra quatro estirpes de *Listeria monocytogenes* usando três métodos de deteção. (resultados expressos com + quando halo de inibição superior a 1 mm).

Método	Estirpes de <i>L. monocytogenes</i>			
	ATCC 35152	EDS-B-LM02	MPI -SaSk-LM05	JI-Me-LM03
Schillinger e Lucke (1989)				
<i>L. sakei</i>				
Ls-Ch-1305	-	+	+	+
Ls-Ch-1320	+	+	-	+
Ls-Ch-1340	-	+	-	-
<i>L. plantarum</i>				
Lp-Ch-5	+	-	+	+
Lp-Ch-70	-	-	-	-
Ammor et al. (2006)				
<i>L. sakei</i>				
Ls-Ch-1305	-	+	+	+
Ls-Ch-1320	+	+	-	+
Ls-Ch-1340	-	+	+	+
<i>L. plantarum</i>				
Lp-Ch-5	+	+	+	+
Lp-Ch-70	-	+	-	-
Tagg et al (1971)				
<i>L. sakei</i>				
Ls-Ch-1305	-	+	+	+
Ls-Ch-1320	-	+	+	+
Ls-Ch-1340	-	+	+	+
<i>L. plantarum</i>				
Lp-Ch-5	+	+	+	+
Lp-Ch-70	-	+	-	-

Os resultados obtidos com sobrenadante, já visando a detecção de BLIS mostraram-se muito semelhantes entre os três métodos comparados (quadro 4.1), sendo que foi com o método proposto por Ammor *et al* (2006) que se detectou um maior número de situações de inibição. O método de Tagg *et al* (1971) também se mostrou interessante para a detecção de antagonismo. Porém, este método tem uma execução complexa, e envolve uma etapa – a de inversão do meio de cultura gelosado sobre a tampa da placa de petri– que tem uma probabilidade considerável de não ser corretamente efetuado, por perda de integridade do bloco de meio de cultura, pelo menos tanto como demonstrou a experiência da sua execução no presente trabalho. Face ao exposto selecionou-se como método de pesquisa de antagonismos o método direto diferido de gota em agar de Schillinger e Lucke (1989) e para pesquisa de BLIS o método proposto por Ammor *et al.* (2006).

4.2.2 Despiste de antagonismos

A atividade antagonista de *L. sakei* e *L. plantarum* foi estudada por antagonismo direto pelo método de gota em agar contra três bactérias Gram-positivas *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Enterococcus* spp. (quadro 4.2) e duas Gram-negativas *Salmonella* spp. e *E coli* (quadro 4.3). Como se pode observar nos quadros 4.2 e 4.3, quase todas as estirpes de *L. sakei* e de *L. plantarum* demonstraram ter atividade contra quase todas as bactérias testadas como produtoras.

Com esta técnica, ainda que se detectem casos de antagonismo, o mecanismo envolvido pode ser diverso, nomeadamente a competição direta por fatores nutritivos do meio, ácido, peróxido de hidrogénio, ou outros compostos envolvidos na manifestação do antagonismo.

Quando se testou a presença de atividade no sobrenadante das culturas produtoras neutralizado, com a atividade do peróxido de hidrogénio eliminada pela ação da catalase, atividade essa designada por BLIS, observou-se que muitas das bactérias testadas como produtoras não manifestaram essa característica (quadros 4.4 e 4.5).

Como era expectável, a atividade contra as bactérias Gram-positivas foi mais comum que a detectada contra as Gram-negativas testada, dado que a região externa da

membrana destas últimas exerce um efeito protetor sobre composto inibidor cujo alvo de atividade é a membrana celular.

Quadro 4.2. Detecção de antagonismo direto diferido (método de gota em agar) por *L. sakei* e *L. plantarum* contra estirpes de *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Enterococcus* spp. (resultados expressos em mm do halo de inibição).

Estirpe produtora	<i>L. monocytogenes</i>				<i>S. aureus</i>				<i>Enterococcus</i> spp.		
	ATCC 35152	EDS-B-LM02	MPI -SaSk-LM05	JI-Me-LM03	ATCC 25923	AI-Me-SA11	EDS-ChM-SA01	EDS-E-SA02	DSM 20477	EDS-Ch-EN01	EDS-Ch-EN44
<i>L. sakei</i>											
ATCC 15521	0	1	0	1	0	1	0	2	1	0	1
DSM 6333	1	2	1	1	1	0	1	1	2	1	1
Ls-Ch-1284	3	3	5	3	2	2	1	2	4	3	2
Ls-Ch-1305	3	3	1	2	3	3	2	2	2	4	2
Ls-Ch-1320	4	2	3	4	1	3	2	3	3	3	3
Ls-Ch-1340	1	4	2	3	3	3	1	2	3	3	3
Ls-Ch-1343	3	3	4	2	2	3	2	3	4	2	3
Ls-Ch-1345	2	3	4	1	2	3	2	3	3	2	2
Ls-Ch-1358	3	4	2	2	2	2	2	3	3	2	3
Ls-Ch-1376	2	3	1	3	1	2	1	2	3	3	3
Ls-Ch-1381	3	4	2	1	2	2	0	1	5	3	1
Ls-Ch-1382	2	4	3	1	2	2	0	1	3	3	1
<i>L. plantarum</i>											
ATCC 14917	1	0	1	1	2	1	0	2	1	1	0
Lp-Ch-5	1	5	2	2	3	2	1	3	1	2	1
Lp-Ch-70	1	5	3	2	1	2	1	2	2	2	1
Lp-Ch-702	3	4	2	1	1	3	4	3	3	3	2
Lp-Ch-725	5	4	3	2	3	2	3	4	2	3	3

Quadro 4.3. Detecção de antagonismo direto diferido (método de gota em agar) por *L. sakei* e *L. plantarum* contra estirpes de *Salmonella* spp. e *E. coli*. (resultados expressos em mm do halo de inibição).

Estirpe produtora	<i>Salmonella</i> spp.					<i>E. coli</i>	
	ATCC 49214	MPI-B-S07	MPI-Mo-S63	JI-Ca-S63	MPI-E-S92	ATCC 35150	MPI-B-EC01
<i>L. sakei</i>							
ATCC 15521	2	1	3	0	1	1	3
DSM 6333	1	1	0	0	0	0	0
Ls-Ch-1284	2	2	3	3	3	0	5
Ls-Ch-1305	3	4	1	2	1	4	2
Ls-Ch-1320	4	2	4	3	1	0	5
Ls-Ch-1340	2	3	2	2	1	3	1
Ls-Ch-1343	0	2	3	2	2	1	5
Ls-Ch-1345	0	1	2	2	1	3	5
Ls-Ch-1358	3	4	3	2	1	3	4
Ls-Ch-1376	3	3	2	3	2	3	3
Ls-Ch-1381	3	3	1	3	3	5	4
Ls-Ch-1382	4	3	1	4	5	5	5
<i>L. plantarum</i>							
ATCC 14917							
Lp-Ch-5	3	4	2	1	2	5	3
Lp-Ch-70	4	4	3	3	1	5	4
Lp-Ch-702	5	2	4	1	2	4	3
Lp-Ch-725	3	3	3	2	2	4	4

Algumas BAL apresentaram atividade antagonista de forma errática contra algumas das bactérias testadas como sensíveis. Das que se mostraram mais estáveis destacam-se as estirpes de *L. sakei* Ls-Ch-1305, Ls-Ch-1320, Ls-Ch-1340 e as estirpes de *L. plantarum* Lp-Ch-5 e Lp-Ch-70. Todas as cinco estirpes apresentaram atividade contra *L. monocytogenes*, que representa uma grande preocupação na indústria de salsicharia, pelo seu carácter ubiquitário e pela capacidade de sobrevivência em produtos com uma reduzida a_w (Rocourt e Cossart, 1997). E contra *S. aureus*, que representa também uma preocupação na indústria de enchidos, pela sua capacidade para se multiplicar em meios com reduzida a_w (Jablonsky e Bohach, 1997). Essas estirpes de

BAL mais interessantes pela inibição contra bactérias Gram-positivas apresentaram também, pontualmente, a capacidade para inibir *Salmonella* spp. e *E. coli*. Pela sua elevada virulência e reduzida dose infecciosa estas enterobactérias patogénicas são uma das grandes preocupações na indústria de produtos cárneos, pois apesar do processo de fabrico impedir a sua multiplicação, não garante a sua eliminação, o que, considerando a sua reduzida dose infecciosa pode ser perigoso (Skandamis e Nychas, 2007).

Quadro 4.4. Detecção de BLIS (método de difusão em poços) por *L. sakei* e *L. plantarum* contra estirpes de *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Enterococcus* spp. (resultados expressos com + quando halo de inibição superior a 1 mm).

Estirpe produtora	<i>L. monocytogenes</i>				<i>S. aureus</i>				<i>Enterococcus</i> spp.		
	ATCC 35152	EDS-B-LM02	MPI -SaSk-LM05	JI-Me-LM03	ATCC 25923	AI-Me-SA11	EDS-ChM-SA01	EDS-E-SA02	DSM 20477	EDS-Ch-EN01	EDS-Ch-EN44
<i>L. sakei</i>											
ATCC 15521	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DSM 6333	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
Ls-Ch-1284	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Ls-Ch-1305	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
Ls-Ch-1320	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
Ls-Ch-1340	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
Ls-Ch-1343	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Ls-Ch-1345	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Ls-Ch-1358	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Ls-Ch-1376	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ls-Ch-1381	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Ls-Ch-1382	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>L. plantarum</i>											
ATCC 14917	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Lp-Ch-5	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Lp-Ch-70	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Lp-Ch-702	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
Lp-Ch-725	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Quadro 4.5. Detecção de BLIS (método de difusão em poços) por *L. sakei* e *L. plantarum* contra estirpes de *Salmonella* spp. e *E. coli*. (resultados expressos com + quando halo de inibição superior a 1 mm).

Estirpe produtora	<i>Salmonella</i> spp.					<i>E. coli</i>	
	ATCC 49214	MPI-B-S07	MPI-Mo-S63	JI-Ca-S63	MPI-E-S92	ATCC 35150	MPI-B-EC01
<i>L. sakei</i>							
ATCC 15521	-	-	-	-	-	-	-
DSM 6333	-	-	-	-	-	-	-
Ls-Ch-1284	-	-	-	-	-	+	+
Ls-Ch-1305	-	-	+	+	-	+	+
Ls-Ch-1320	-	-	+	-	-	-	-
Ls-Ch-1340	-	+	-	-	-	-	-
Ls-Ch-1343	+	-	+	-	-	-	-
Ls-Ch-1345	-	-	-	-	-	-	-
Ls-Ch-1358	-	-	-	-	+	-	-
Ls-Ch-1376	-	-	+	-	-	+	-
Ls-Ch-1381	+	-	+	-	-	-	-
Ls-Ch-1382	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i>							
ATCC 14917	-	-	-	-	-	-	-
Lp-Ch-5	-	+	-	-	-	-	-
Lp-Ch-70	-	-	-	-	-	-	-
Lp-Ch-702	-	-	-	-	+	-	-
Lp-Ch-725	-	-	-	-	-	-	-

4.3. Efeito de condições de fabrico de chouriço na atividade de BLIS de *L. sakei* contra *Listeria monocytogenes*

4.3.1. Efeito da temperatura de crescimento, do pH e do teor em sal na produção de BLIS

No sentido de testar o efeito de alguns ingredientes e condições habitualmente utilizados no fabrico de enchidos na produção de BLIS, com três estirpes de *L. sakei* avaliou-se a atividade antagonista do sobrenadante obtido do crescimento de culturas em MRS suplementado com 7.5% de vinho, 200 mg/L de nitrato de potássio e 200 mg/L de nitrito de sódio. Utilizou-se como fatores variáveis o teor em sal 2,4 e 6%, o pH de 4,5- 5,5 e 6,5 e a temperatura de incubação de 7°C, 15°C e 30°C. Os sobrenadantes das culturas a 30°C e a 15°C foram recolhidos às 24h e 48h, respectivamente, e os obtidos a 7°C apenas ao fim de 5 dias de incubação. Os sobrenadantes neutralizados a pH 6,5 com NaOH, esterilizados por filtração e tratados com catalase para eliminar o efeito inibitório do peróxido de hidrogénio foram testados para a sua atividade antagonista contra 4 estirpes de *Listeria monocytogenes* pela técnica de difusão em poços. A biomassa estimada a partir da D.O. a 600 nm foi registada para todas as condições de ensaio.

No quadro 4.6, apresentam-se os resultados da deteção da atividade antagonista dos sobrenadantes obtidos de culturas incubadas a 15° e 30°C. A 7°C não foi detectado qualquer antagonismo. Os resultados são apresentados como percentagem de casos em que foi detectado antagonismo, utilizando o conjunto de estirpes de *L. sakei* e de *L. monocytogenes* como repetições. A comparação foi efetuada para a totalidade dos casos com incubação às temperaturas referidas e especificamente para cada subgrupo obtido com diferentes formulações do meio de cultura (3 níveis de pH e 3 teores em sal). Assim, a partir da observação dos resultados apresentados no quadro 4.6, verifica-se que nas culturas obtidas com incubação a 7°C nunca foi detectado qualquer tipo de antagonismo contra o microrganismo patogénico usado como sensível no presente trabalho.

Quadro 4.6. Distribuição dos casos em que foi detectada inibição de *L. monocytogenes* por *L. sakei* em função da temperatura de incubação da cultura, nas diferentes condições testadas (resultados expressos em proporção de amostras – por linha – em que foi detectado antagonismo).

Efeito	Temperatura			χ^2 ; p
	7°C	15°C	30°C	
<i>pH</i>				
4,5	-(¹)	0	100	4,545; 0,033
5,5	-	50	50	Ns
6,5	-	23,1	76,9	Ns
<i>Teor em sal</i>	-			
1%	-	29,4	70,6	Ns
2%	-	31,2	68,8	Ns
3%	-	50	50	Ns
<i>Total</i>	-	33,3	66,7	4,506; 0,034

A comparação entre a frequência de detecção de antagonismos em sobrenadantes obtidos de culturas incubadas a diferentes temperaturas não inclui os resultados deste ensaio a 7°C. Contudo nessas culturas, apesar do período de incubação ter sido consideravelmente mais prolongado, o crescimento da cultura foi claramente inferior, pelo que consideramos que incluir esses resultados na análise estatística introduziria um viés decorrente da ausência do efeito não estar ligado à temperatura, mas sim à quantidade de biomassa que era inequivocamente menor. Quando comparamos os resultados obtidos para as temperaturas de 30° e 15°C, observa-se que na maioria (66,7%) dos casos em que foi detectada inibição de *L. monocytogenes* o sobrenadante foi obtido de culturas incubadas a 30°C. Por outro lado, as culturas incubadas a 15°C representaram somente 33,3%. Essa distribuição determinou diferenças significativas entre essas duas temperaturas ($p < 0,05$).

O diferente padrão das diferenças observadas a 15°C e a 30°C poderão estar relacionadas com a diferente biomassa da cultura, que era significativamente menor nas culturas obtidas a 15°C (quadro 4.10).

Ao avaliar o efeito da temperatura de incubação discriminadamente nas 3 condições de pH e teores em sal testados, observa-se que, nos casos em que as culturas cresceram em meio de cultura com pH ajustado a 4,5 só quando a incubação foi efetuada a 30°C é que se detectaram casos de inibição. Nos casos, em que o pH do meio de cultura tinha um pH de 5,5 ou de 6,5 não houve qualquer influência da temperatura ($p \geq 0,05$). No que se refere ao efeito da temperatura na manifestação da atividade antagonista com o sobrenadante obtido em meios de cultura com diferentes concentrações de sal, verificou-se que, ainda que com 2 e 4% de sal as culturas multiplicadas a 30°C tenham manifestado uma maior proporção de inibição, a diferença demonstrada entre os dois grupos não é significativa ($p \geq 0.05$).

Como a temperatura tem sido apontada por vários autores (Abee *et al.*, 1995; Urso *et al.*, 2006) como um dos fatores ambientais que mais contribui para estimular a produção de BLIS fundamentalmente associada a produção de biomassa. Por outro lado, sendo as bacteriocinas compostos produzidos por BAL de forma a melhorar a sua posição competitiva em ecossistemas com microflora variada, a existência de fatores sub-ótimos nas condições de incubação podem eventualmente estimular a sua produção. No caso de alguns grupos de bacteriocinas que necessitam de um fator estimulante para a sua produção (De Martinis e Freitas., 2003; Dortu *et al.*, 2008) como a sakacina A e a sakacina P, é necessário um valor ótimo de produção entre os 25° e os 30°C, sendo que a incubação a 37° C pode ser prejudicial para a manifestação da atividade antagonista, pois alguns dos elementos necessários para que aquele efeito ocorra são codificados em plasmídeos, podendo haver a sua perda por incubação a temperaturas superiores a 35°C. Do ponto de vista aplicado, os resultados são considerados interessantes, pois quando, no início do processo de fabrico, a massa do enchido é mantida em refrigeração durante 24 a 48h, a atividade antagonista das BAL não se manifestará, pelo menos mediada por uma BLIS, pois como se pode observar no presente ensaio, a 7°C nenhuma das três estirpes testadas revelou essa capacidade. Depois dessa fase de repouso inicial e após o enchimento, os enchidos são fumados, o que corresponde a um aumento da temperatura, que pode alcançar valores entre 25° a 30°C.

Assim, nessa fase em que se observa um grande crescimento da população láctica do enchido (Diez e Patarata, 2013) as condições de temperatura são favoráveis à produção de BLIS, que nesta fase poderão ter uma importância determinante, pois esse aumento de temperatura poderá também favorecer a multiplicação de microrganismos

patogénicos eventualmente presentes no produto, nomeadamente *Listeria monocytogenes*. Depois de fumados, os enchidos são secos, ou nas condições ambientais naturais que se observam em pequenas unidades de fabrico de montanha, ou em câmaras climáticas existentes no ambiente industrial. Nesta fase, a temperatura é menor que na fumagem, mas esta não pode ser inferior a 10°C, pois aí a secagem é muito dificultada, o que é prejudicial para o produto, e as modificações químicas que se operam no produto de forma a determinar o seu aroma, seriam muito condicionadas. No entanto, também a essa temperatura (15°C), se demonstrou que, ainda que com menor frequência, há produção de BLIS.

Considerando que *L. monocytogenes* é uma bactéria psicrófila, e com uma capacidade para se multiplicar em meios com atividade da água relativamente reduzida, a utilização de estirpes de *L. sakei* com capacidade para produzir BLIS a 15°C configura-se como um contributo interessante para o controlo dessa bactéria patogénica nesta fase em que o produto ainda não atingiu níveis de desidratação que determinam uma atividade de água segura.

A utilização de meios de cultura com diferentes teores em sal visou simular as diferentes concentrações deste ingrediente que podem ser encontradas num enchido. Os resultados de distribuição de casos de inibição em função do teor em sal encontram-se referidos no quadro 4.7. Considerando a totalidade de fatores ensaiados, observa-se que é com os dois teores de sal mais reduzidos testados que se verifica uma mais frequente produção de BLIS, com 43,6% e 41,0% dos casos nos meios de cultura com 2% e 4% de sal, respetivamente. Quando, o teor de sal ascendeu os 6%, como se poderá eventualmente observar num enchido já seco, somente em 15,4% dos casos se verifica inibição. A diferença significativa ($p < 0,05$) apresentada pelos sobrenadantes com diferentes teores em sal foi determinada pela menor ocorrência de BLIS com o uso de 6% de sal, como se infere pelo seu mais elevado resíduo padronizado (-2,6) que, sendo em termos absoluto superior a 1.96, indica que esta célula da tabela de contingência foi a responsável pela rejeição da hipótese nula determinando assim a significância da diferença encontrada.

Quando se analisa o efeito de teor em sal para as diferentes condições experimentais testadas, observa-se que quando as culturas cresceram a 15°C a ocorrência de BLIS foi similar ($p \geq 0,05$) entre os três níveis de sal, porém quando a temperatura de incubação foi de 30°C, as culturas com 6% de sal manifestaram uma

menor capacidade de inibir *L. monocytogenes*, sendo que apenas 11,5% dos casos de inibição observados provinham de um meio de cultura com essa concentração de sal.

Quadro 4.7. Distribuição dos casos em que foi detectada inibição de *L. monocytogenes* por *L. sakei* em função do teor em sal do meio de cultura, nas diferentes condições testadas (resultados expressos em proporção de amostras – por linha – em que foi detectado antagonismo; valores entre parêntesis indicam o resíduo padronizado).

Efeito	Teor em sal			χ^2 ; p
	2%	4%	6%	
<i>Temperatura</i>				
7°C	0	0	0	-
15°C	38.5 (-0,4)	38,5 (-0,4)	23,1 (0,8)	Ns
30°C	46,2 (1,6)	42,3 (1,1)	11,5 (-2,7)	7,396; 0,025
<i>pH</i>				
4,5	83,3 (2,7)	16,7 (-0,9)	0 (-1,8)	7,636; 0,022
5,5	35,0 (0,2)	35,0 (0,2)	30,0 (-0,4)	Ns
6,5	38,5 (0,4)	61,5 (2,4)	0 (-2,8)	9,199; 0,010
<i>Total</i>	43,6 (1,5)	41,0 (1,1)	15,4 (-2,6)	6,947; 0,031

Apesar das BAL serem microrganismos reputadamente resistentes a concentrações de sal moderadamente elevadas (Leistner, 1992) a observação do presente trabalho sugere que esse fator de stress terá contribuído para inibir a produção, ou a ação das referidas BLIS.

Quando as estirpes de *L. sakei* foram multiplicadas em meio de cultura com pH de 4,5, só quando o teor em sal era mais reduzido (2%), se detectou atividade antagonista com frequência (83,3% dos casos; RP= 2.7). Em condições menos favoráveis- pH 4,5 e 6% de sal- nenhuma das estirpes manifestou capacidade para produzir antagonismo. As condições intermédias de pH testada no presente trabalho, a mais próxima dos valores encontrados nos chouriços tradicionais portugueses (5,5) (Colaço-do-Rosário *et al.* 2000), demonstrou-se interessante do ponto de vista tecnológico, pois independentemente do teor em sal, foram observados casos de

inibição. Com o pH a 6,5, situação teoricamente mais favorável à multiplicação microbiana, evidenciou-se que a produção de BLIS é detida quando se usa 6% de sal e é máxima com 4% de sal (61.5% dos casos; RP= 2.4).

O efeito do teor em sal sobre a produção e ação de BLIS é um aspeto que não tem merecido muita importância por parte dos investigadores. É de evidenciar, que no decorrer do presente trabalho o efeito do pH e da temperatura é somente testado na perspectiva da produção de BLIS e não na sua ação contra a bactéria sensível, pois esse efeito é eliminado na fase de teste de BLIS, a temperatura inerentemente ao procedimento e o pH pelo efeito da neutralização. Pelo contrário, quando se estuda o efeito do sal, com os ensaios realizados, não conseguimos isolar se esse efeito se coloca ao nível da produção ou da ação de BLIS, uma vez que este ingrediente não é retirado do sobrenadante quando se testa o antagonismo. Contudo, os resultados obtidos indicam no sentido do efeito se situar ao nível da produção e não da ação, pois seria expectável que a maiores teores em sal correspondesse uma maior sensibilidade de *L. monocytogenes*, o que não se observou no decorrer do trabalho. O pH por sua vez, tem uma marcada influência no crescimento das culturas microbianas e na produção e ação de BLIS (Sorrels *et al.*, 1989). Para além do efeito que o pH tem no aumento da biomassa interfere na posterior libertação de alguns compostos que permanecem adsorvidos na parede celular da célula produtora. No quadro 4.8 encontram-se apresentados os resultados da distribuição dos casos de deteção de antagonismo contra *L. monocytogenes*, das culturas de *L. sakei* obtidas em meio de cultura com pH ajustado a 4,5- 5,5 e 6,5.

Considerando a totalidade das condições de ensaio demonstra-se que o pH intermédio é o mais favorável para a produção de BLIS com mais de metade (51.3%) dos casos de inibição detectados. Essa maior ocorrência a pH 5,5 e a mais reduzida a pH de 4,5 (15.4%) determinam a diferença significativa ($p < 0,05$) observada. Como se infere pelo elevado valor absoluto do resíduo padronizado (2.6) que se apresenta.

Os detalhes do efeito do pH nos grupos incubados a 15° ou 30°C e em meio de cultura com 1,2 ou 3% de sal foram já referenciados aquando da discussão dos resultados dos quadros 4.6 e 4.7, ainda que a comparação estatística não tenha sido aí introduzida.

Quadro 4.8. Distribuição dos casos em que foi detectada inibição de *L. monocytogenes* por *L. sakei* em função do pH do meio de cultura, nas diferentes condições testadas (resultados expressos em proporção de amostras – por linha – em que foi detectado antagonismo; valores entre parêntesis indicam o resíduo padronizado).

Efeito	pH			χ^2 ; p
	4,5	5,5	6,5	
<i>Temperatura</i>				
7°C	0	0	0	-
15°C	0 (-2,7)	76,9 (3,6)	23,1 (-0,8)	13,817; 0,001
30°C	16,7 (-1,3)	38,5 (0,6)	38,5 (0,6)	Ns
<i>Teor em sal</i>				
2%	29,4 (-0,4)	41,2 (0,8)	29,4 (0,4)	Ns
4%	6,2 (-2,6)	43,8 (1,0)	50,0 (1,6)	6,911; 0,032
6%	0 (1,8)	100 (3,6)	0 (-1,8)	13,091; 0,001
<i>Total</i>	15,4 (-2,6)	51,3 (2,6)	33,3 (0)	9,199; 0,010

A temperatura de incubação de 15°C combinada com pH do meio de 5,5 mostrou-se como uma das condições mais favoráveis à produção de BLIS (76,9%; RP= 2,6) determinando juntamente com a ausência de produção em meio de cultura com pH 4,5 a diferença muito significativa ($p < 0,05$) observada. Por outro lado, a 30°C não se observou qualquer interferência do pH na produção de BLIS. Na comparação da frequência de inibição nos grupos com diferentes teores em sal, merece especial destaque, pelo facto de com 6% de sal todos os casos de inibição observados foram a partir do sobrenadante obtido com o pH a 5,5.

A utilização de três estirpes de *L. sakei* foi determinada pelo facto de eventualmente algumas delas poderem possuir características particulares de produção de BLIS em condições adversas, simulando as condições do fabrico de chouriço tradicional. No quadro 4.9 apresenta-se a comparação da frequência de inibição detectada para as 3 estirpes de *L. sakei* testadas. Aqui, observa-se uma distribuição quase equitativa ($X^2 = 0,75$; $p = 0,689$) dos casos de inibição detectados pelas três

estirpes. Quando se decompôs a distribuição dos casos de antagonismo detectados pelas condições do ensaio, observou-se que somente com o teor máximo de sal (6%) se detectava uma situação em que as três estirpes não eram similares ($p < 0,01$), dado que todos os casos de inibição nessas condições foram produzidos pela estirpe de Ls-Ch-1305. Na comparação entre os diferentes valores de pH do meio de cultura observou-se uma tendência ($p = 0,051$) para a estirpe Ls-Ch-1305 produzir uma maior frequência de inibição que as outras estirpes.

Quadro 4.9. Distribuição dos casos em que foi detectada inibição de *L. monocytogenes* por *L. sakei* em função da estirpe testada, nas diferentes condições testadas (resultados expressos em proporção de amostras – por linha – em que foi detectado antagonismo; valores entre parêntesis indicam o resíduo padronizado).

Efeito	Estirpe de <i>L. sakei</i>			χ^2 ; p
	Ls-Ch-1305	Ls-Ch-1320	Ls-Ch-1340	
<i>Temperatura</i>				
7°C	-	-	-	-
15°C	46,2 (1,0)	30,8 (-0,2)	23,1 (-0,8)	1,224; 0,542
30°C	34,6 (0,2)	34,6 (0,2)	0,8 (-0,3)	0,101; 0,951
<i>pH</i>				
4,5	16,7 (-0,9)	50,0 (0,9)	33,3 (0)	1,091; 0,580
5,5	55,0 (2,4)	20 ,0 (-1,5)	25,0 (-0,9)	5,954; 0,051
6,5	23,1 (-0,9)	46,2 (1,1)	30,8 (-0,2)	1,314 (0,518)
<i>Teor em sal</i>				
2%	17,6 (-1,6)	47,1 (1,4)	35,3 (0,2)	2,926; 0,232
4%	37,5 (0,4)	31,2 (-0,2)	31,2 (-0,2)	0,161; 0,924
6%	100 (3,6)	0	0	13,091; 0,001
<i>Total</i>	38,5 (0,8)	33,3 (0)	28,2 (-0,8)	0,751; 0,687

A atividade antagonista mediada por BLIS é habitualmente associada à quantidade de biomassa da bactéria produtora (Blom *et al.*, 1997). Com o intuito de testar os efeitos em estudo no presente trabalho foram enviesadas pela abundância de biomassa, comparando-se esse indicador da diminuição da população microbiana para

os casos em que foi detectada atividade antagonista contra *L. monocytogenes* (Quadro 4.10).

Observou-se, que a ocorrência de BLIS era independente ($p > 0,05$) da biomassa, para cada temperatura testada (15°C e 30°C). Não obstante, a biomassa média obtida a 15°C é significativamente menor ($p < 0,001$) que a obtida a 30°C, pelo que a comparação entre as duas temperaturas realizada deve ter esse enviesamento em consideração.

Quadro 4.10. Associação entre a ocorrência de inibição (BLIS) e a biomassa da cultura, para cada temperatura ensaiada (resultados expressos em D.O. a 600 nm, 10mm)

Temperatura	Sem inibição	Com inibição	P
15°C	0,33±0,22	0,42±0,18	0,156
30°C	2,03±0,21	2,04±0,21	0,842
Efeito da temperatura $p < 0,001$			

Considerando que os três efeitos em estudo mostraram individualmente o seu efeito sobre a produção de BLIS contra *L. monocytogenes*, procedeu-se à análise multivariada dos 3 fatores por regressão logística, no sentido de quantificar a contribuição de cada nível de cada variável em estudo para a ocorrência de inibição. Adicionalmente, e ainda que já se tenha demonstrado que a biomassa não influencia a produção de BLIS, para cada temperatura testada, introduziu-se no modelo para um eventual contributo que pudesse estar latente na variável.

No quadro 4.11 apresenta-se a síntese do modelo obtido por regressão logística. Observou-se que, como era esperado, a biomassa não era significativa para o modelo pelo que foi retirada. Contudo, a temperatura de incubação dos meios de cultura, ainda que tivesse demonstrado algum interesse e influência na ocorrência de inibição, também foi retirada por se mostrar não significativa para o modelo de estudo. Assim, foram consideradas apenas as variáveis pH e teor em sal do meio de cultura, sendo que a classe de referência em ambos os casos foi a primeira (2% de sal ou pH de 4,5). Assim, e considerando a variável teor em sal do meio de cultura observa-se que quando se aumenta de 2% para 4% o teor em sal do meio de cultura a probabilidade de *L. sakei*

produzir antagonismo contra *L. monocytogenes* é reduzida em 0,927 vezes, mas quando o incremento do teor em sal é de 2% para 6% a redução dessa probabilidade é de 0,280.

No que se refere ao pH do meio de cultura, o aumento de um valor (de 4,5 para 5,5) corresponde a um aumento em cerca de 5 vezes (4,925) da probabilidade de *L. sakei* produzir uma BLIS ativa contra *L. monocytogenes*. Se o aumento de pH for de 2 unidades (de 4,5 para 6,5) esse aumento de probabilidade é somente de 2,340 vezes.

Quadro 4.11. Resultados do modelo de análise de regressão logística para estimar a probabilidade de ocorrência de antagonismo contra *L. monocytogenes* considerando os fatores teor em sal e pH do meio de cultura

Variável	Beta	EP	p	Razão de Odds	IC 95%
Teor em sal 2% CR					
Teor em sal 4%	-0,076	0,452	0,866	0,927	0,382-2,246
Teor em sal 6%	-1,271	0,568	0,025	0,280	0,092-0,854
pH-5 CR					
pH-6	1,594	0,550	0,004	4,925	1,676-14,474
pH-7	0,850	0,597	0,155	2,340	0,726-7,546
Intercepto	-2,157	1,622	0,184		
Log verossimilhança 153.996; p =0.002					

EP – Erro padrão; IC – Intervalo de confiança; CR – classe de referência.

4.3.2. Efeito da adição de vinho na detecção da atividade de BLIS

No sentido de avaliar se o vinho, que é um ingrediente comumente utilizado no tempero do chouriço, tem alguma influência na manifestação da atividade antagonista de *L. sakei* contra *L. monocytogenes*, utilizou-se a técnica de difusão em poços com o meio de cultura suplementado com vinho. Os resultados (quadro 4.12) mostram que na esmagadora maioria dos casos o perfil de inibição se manteve o mesmo. Apesar de algumas evidências (Patarata *et al*, 2005) demonstrarem que o vinho tem um importante contributo no controlo de *L. monocytogenes* em chouriço, os resultados do presente trabalho não permitem evidenciá-lo, pois o facto da técnica ser qualitativa e não quantitativa não permite detetar uma eventual sinergia entre o efeito da BLIS e do vinho.

Quadro 4.12. Resultados da pesquisa de BLIS efetuada com três estirpes de *L. sakei* contra quatro estirpes de *L. monocytogenes* usando o método de difusão em poços sem e com suplementação com 7,5% de vinho (resultados expressos com + quando halo de inibição superior a 1 mm).

Método	Estirpes de <i>L. monocytogenes</i>			
	ATCC 35152	EDS-B-LM02	MPI -SaSk-LM05	JI-Me-LM03
Sem vinho ⁽¹⁾				
Ls-Ch-1305	+	+	+	+
Ls-Ch-1320	+	+	-	+
Ls-Ch-1340	-	+	-	+
Com 7,5% vinho				
Ls-Ch-1305	+	+	+	+
Ls-Ch-1320	+	+	-	+
Ls-Ch-1340	-	+	+	+

⁽¹⁾ Resultados do quadro 4.4 com o método Ammor *et al.* (2006)

4.3.3. Efeito combinado da utilização de *L. sakei* produtores de BLIS, com vinho e glúcidos fermentáveis em massa de chouriço

O efeito da utilização de diferentes culturas de arranque de *L. sakei*, da utilização de vinho e da suplementação com glúcidos fermentáveis sobre o comportamento de dois microrganismos patogénicos com importância na segurança sanitária de enchidos – *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. foram testados com um ensaio com desenho experimental a três efeitos: *L. sakei* (ausente, *L. sakei* Ls-Ch-1305, *L. sakei* Ls-Ch-1340 e *L.sakei* DSM 6333), vinho (ausente e com 7,5% adicionado à mistura) e glúcidos fermentáveis (ausente e 2% de mistura de glucose/lactose na proporção 1:3). O ensaio foi elaborado em massa de chouriço, no sentido de isolar somente os efeitos em estudo, sem que esses fossem influenciados pelo efeito da redução da a_w , que é o principal fator que determina a inibição de microrganismos patogénicos em enchidos secos-crus. Assim, o ensaio foi monitorizado 16h após a inoculação e mantido a $4\pm 2^\circ\text{C}$ e depois de 3 e 7 dias de incubados a 15°C (temperatura selecionada para simular as condições em que o chouriço é seco).

Os resultados da contagem de BAL encontram-se apresentados no quadro 4.13. e ilustrados na figura 4.1 . Genericamente as contagens no ensaio de controlo, sem adição de BAL, foram mais reduzidas, como era de esperar. No início do ensaio os lotes inoculados apresentavam uma contagem para as BAL compreendida entre 7 e 8 log ufc/g, o que corresponde ao nível de inoculação pretendido. As amostras controlo apresentam valores entre os 3 e 4 log ufc/g. Ao longo do tempo de incubação da unidade experimental, o crescimento das culturas mostrou-se mais elevado nas amostras controlo do que nas inoculadas. Nas primeiras ocorreu um aumento em cerca de 1,5 log ufc/g nas amostras sem glucose/lactose e cerca de 2 log ufc/g nas que continham adição de glúcidos. Por sua vez, nas amostras inoculadas a contagem de BAL manteve-se sensivelmente constante ao longo do ensaio.

A partir dos 3 dias em que as amostras se encontravam submetidas a incubação a uma temperatura de 15°C , que permite a multiplicação de qualquer um dos microrganismos testados, nas amostras tratadas com vinho e com glúcidos fermentáveis o ensaio controlo relativamente ao inoculado com *L. sakei* 3 (DSM 63333) representa uma diferença significativa de cerca de 2 log ufc/g, logo a contagem é inferior ($p<0,05$). Contudo aos 7 dias de incubação e nas mesmas condições não se verifica qualquer alteração.

Quadro 4.13. Contagem de bactérias do ácido láctico em massa de chouriço preparada com e sem vinho, com e sem adição de glucose e lactose e com diferentes culturas de arranque de *L. sakei* (média $\pm$ desvio padrão)

	Sem vinho				Com vinho				Sig		
	Controlo	Ls-Ch-1305	Ls-Ch-1340	DSM 6333	Controlo	Ls-Ch-1305	Ls-Ch-1340	DSM 6333	V	B	V*B
<i>Sem</i>											
<i>Glu+Lac</i>											
16 h	3,22 $\pm$ 0,25abc	7,60 $\pm$ 0,68	7,56 $\pm$ 0,54	7,58 $\pm$ 0,52	3,41 $\pm$ 0,21	7,64 $\pm$ 0,54	7,47 $\pm$ 0,59	7,53 $\pm$ 0,59	ns	***	ns
3 dias	4,03 $\pm$ 0,24	7,94 $\pm$ 0,18	7,93 $\pm$ 0,04	7,97 $\pm$ 0,01	3,50 $\pm$ 0,28	7,26 $\pm$ 0,13	7,77 $\pm$ 0,23	7,81 $\pm$ 0,38	**	***	ns
7 dias	4,73 $\pm$ 0,25	7,98 $\pm$ 0,10	8,43 $\pm$ 0,64	8,34 $\pm$ 0,62	5,54 $\pm$ 0,09	7,87 $\pm$ 0,11	8,38 $\pm$ 0,60	7,80 $\pm$ 0,14	ns	***	ns
<i>Com</i>											
<i>Glu+Lac</i>											
16 h	3,79 $\pm$ 0,16	7,56 $\pm$ 0,51	7,51 $\pm$ 0,56	7,60 $\pm$ 0,62	3,44 $\pm$ 0,20	7,31 $\pm$ 0,33	7,64 $\pm$ 0,37	7,43 $\pm$ 0,49	ns	***	ns
3 dias	4,22 $\pm$ 0,32	7,54 $\pm$ 0,57	7,90 $\pm$ 0,17	7,36 $\pm$ 0,16	3,44 $\pm$ 0,62	7,53 $\pm$ 0,64	7,88 $\pm$ 0,10	7,83 $\pm$ 0,11	ns	***	ns
7 dias	5,58 $\pm$ 0,52	7,90 $\pm$ 0,10	7,43 $\pm$ 0,63	7,48 $\pm$ 0,59	5,23 $\pm$ 0,30	7,42 $\pm$ 0,62	7,37 $\pm$ 0,66	7,40 $\pm$ 0,65	ns	***	ns

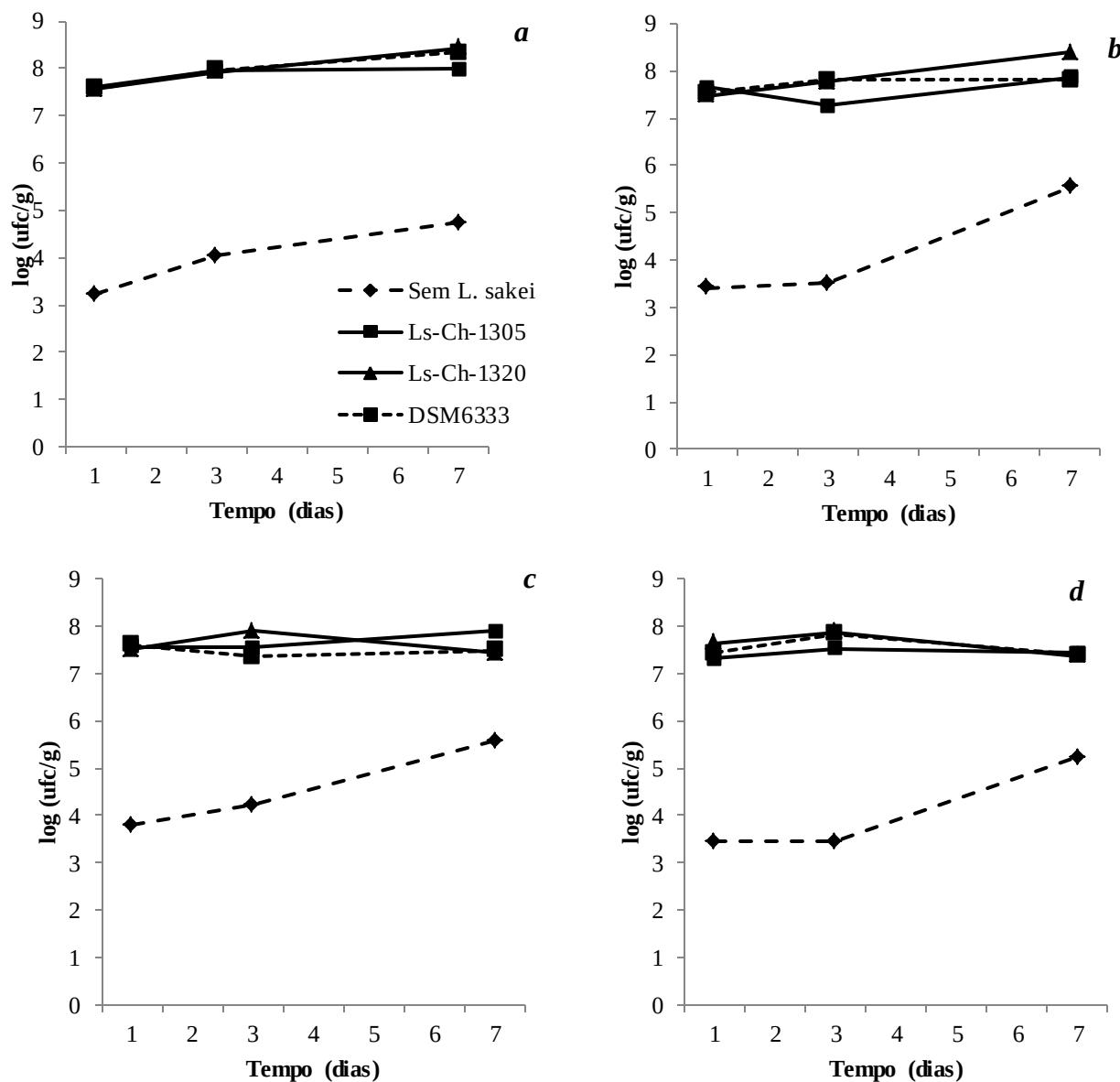


Figura 4.1. Evolução da contagem de BAL ao longo do ensaio. **a** sem vinho e sem glúcidos; **b** com de vinho e sem glúcidos; **c** sem vinho, com glúcidos, **d** com vinho e com glúcidos.

Os resultados relativos à contagem de *Salmonella* estão expressos no quadro 4.14 e ilustrados conforme a figura 4.2.

Neste caso, em qualquer condição experimental (vinho ou glúcidos) os ensaios sem inoculação de BAL apresentaram, na maioria dos casos contagens superiores de *Salmonella*. Observou-se que ao longo do período de incubação o microrganismo patogénico aumentou na unidade experimental sem adição de vinho e de glúcidos.

Consequentemente, nos ensaios em que se introduziu um dos fatores em estudo, a contagem de *Salmonella* spp. manteve-se estável ao longo do tempo de incubação. Apenas, quando se introduziu os dois fatores em conjunto é que se observou um decréscimo na contagem deste microrganismo patogénico com valores compreendidos entre cerca de 1 e 2 log ufc/g, sendo estes considerados responsáveis pela diminuição verificada quando se utilizou uma cultura de arranque de *L. sakei* pois na sua ausência a contagem final é superior à inicial.

O efeito do vinho foi notório nos ensaios sem glúcidos em todos os tempos de análise, sendo que em todos os tempos, determinou-se os valores médios menores do que nas amostras tratadas com vinho. Assim, a diferença média às 16 h apresentou valores de cerca de 0,3 log ufc/g, aos 3 dias a diferença média rondava os 0,9 log ufc/g e aos 7 dias ascendia a cerca de 1,3 log ufc/g. Para o estudo realizado, a utilização de BAL também determinou diferenças significativas quanto à contagem de *Salmonella* spp., em algumas condições em análise. É de realçar, que nas amostras sem adição de glúcidos e vinho a diferença entre o controlo e as amostras inoculadas. Quando se utilizou vinho, como a contagem de *Salmonella* no controlo não inoculado era mais reduzida, não foi tão evidente o efeito da adição de culturas de arranque de *L. sakei*. Destaca-se a reduzida contagem nas amostras inoculadas com *L. sakei* 2 que apresentavam uma contagem ($4,22 \pm 0,20$) significativamente menor ($p < 0,05$) do que em qualquer outra condição de ensaio, como se pode comprovar pelo valor médio obtido.

Nas amostras sem adição de glúcidos fermentáveis, aos 3 dias o uso de culturas de arranque não determinou qualquer efeito na contagem de *Salmonella*. Aos 7 dias esse efeito mostrou-se significativo ainda que quando se comparam as médias de cada unidade experimental se observe que as diferenças são somente pontuais, entre as amostras inoculadas com *L. sakei* Ls-Ch-1305 e DSM 6333 em chouriços preparados com vinho, com as contagens mais reduzidas próximas de 4 log ufc/g, e as amostras do ensaio sem vinho não inoculado e inoculado com o microrganismo produtor *L. sakei* Ls-Ch-1340 apresentavam contagens superiores, com cerca de 6,8 log ufc/g. Por outro lado, nas amostras em que se adicionou glucose/lactose, houve um aumento de cerca de 1,7 unidade log para o experimento controlo não inoculado, que quando se adicionou vinho esse aumento foi considerado residual, uma vez que foi de apenas 0,5 log ufc/g.

Quadro 4.14. Contagem de *Salmonella* spp. em massa de chouriço preparada com e sem vinho, com e sem adição de glucose e lactose e com diferentes culturas de arranque de *L. sakei* (média $\pm$ desvio padrão)

		Sem vinho				Com vinho				Sig		
		Controlo	Ls-Ch-1305	Ls-Ch-1340	DSM 6333	Controlo	Ls-Ch-1305	Ls-Ch-1340	DSM 6333	V	B	V*B
63	Sem Glu+Lac											
	16 h	5,43 ± 0,02	4,91 ± 0,13	4,89 ± 0,02	4,91 ± 0,09	5,09 ± 0,12	4,78 ± 0,09	4,22 ± 0,20	5,02 ± 0,09	**	***	**
	3 dias	6,59 ± 0,16	6,22 ± 0,62	6,57 ± 0,12	6,49 ± 0,06	5,37 ± 0,41	4,89 ± 0,12	4,94 ± 0,76	5,11 ± 0,27	***	ns	ns
	7 dias	6,78 ± 0,11	5,98 ± 0,10	6,78 ± 0,04	6,14 ± 1,19	6,30 ± 0,91	4,12 ± 0,64	4,75 ± 0,21	4,09 ± 0,01	***	**	ns
	Com Glu+Lac											
	16 h	5,00 ± 0,06	5,02 ± 0,08	4,98 ± 0,01	5,28 ± 0,03	5,17 ± 0,43	5,10 ± 0,22	5,05 ± 0,21	5,19 ± 0,45	ns	ns	ns
	3 dias	6,64 ± 0,58	5,22 ± 0,12	5,01 ± 0,10	5,61 ± 0,50	4,66 ± 0,24	4,09 ± 0,30	5,07 ± 0,15	5,09 ± 0,58	***	**	**
	7 dias	6,69 ± 0,01	5,34 ± 0,62	4,88 ± 0,03	5,75 ± 0,08	5,70 ± 0,50	3,22 ± 0,37	3,92 ± 0,03	4,35 ± 0,12	***	***	ns

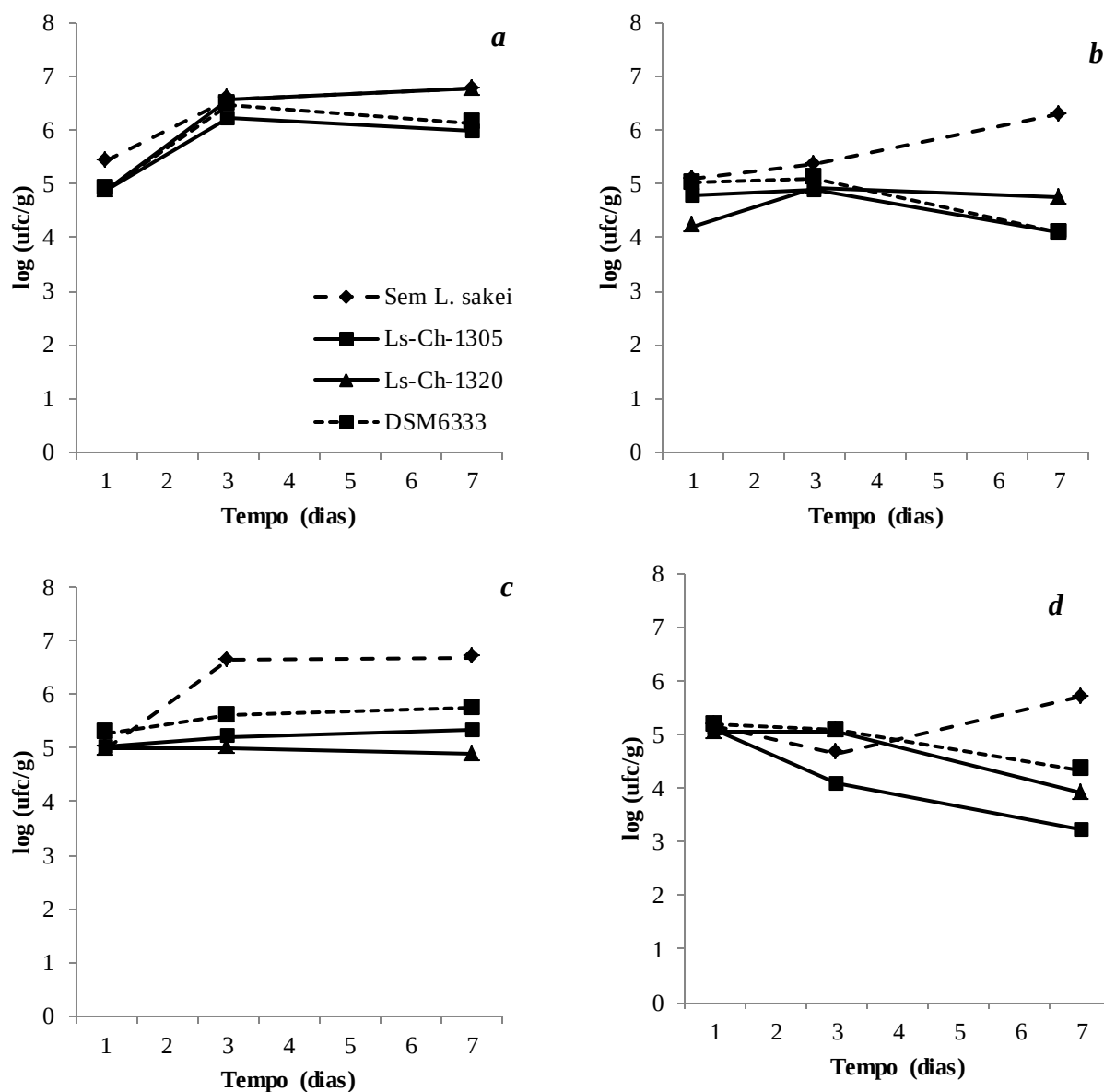


Figura 4.2. Evolução da contagem de *Salmonella* spp. ao longo do ensaio. **a** sem vinho e sem glícidos; **b** com de vinho e sem glícidos; **c** sem vinho, com glícidos, **d** com vinho e com glícidos.

Em condições, nas quais se introduziram glícidos fermentáveis e com/sem adição de vinho, aos 3 e 7 dias de incubação verificou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) determinadas pela cultura de arranque de *L. sakei*. Aquando das 16h, observou-se que na massa de chouriço com vinho adicionado o valor logarítmico de *Salmonella* é inferior em cerca de 0,4 log ufc/g do que na massa sem vinho.

Com o decorrer do tempo, entre as 16h e os 7 dias de incubação nas amostras em que se introduziu vinho e glúcidos fermentáveis a contagem de *Salmonella* é relativamente inferior, o que se pode comprovar a partir dos valores médios ao fim dos 7 dias que são de $4,78 \pm 0,70$ contra $5,67 \pm 0,75$ para a massa sem estes ingredientes na sua composição. Nas amostras em que se adicionou vinho e glúcidos, observou-se que tanto aos 3 como aos 7 dias de incubação as amostras com Glu+Lac e sem vinho no ensaio controlo e no que foi inoculado com *L. sakei* Ls-Ch- 1305 ocorre um ligeiro aumento ao passo que em *L. sakei* Ls-Ch-1340 e *L. sakei* DSM 6333 se verificou o efeito contrário.

Os resultados quanto à contagem de *Listeria monocytogenes* visam-se apresentados no quadro 4.15 e complementados com a ilustração referente à figura 4.3. De uma forma global, observou-se que para cada unidade experimental sem vinho ou glúcidos, durante o tempo de incubação ocorreu diminuição da contagem de *Listeria monocytogenes*, aquando da inoculação de culturas de arranque de *L. sakei*, uma vez que sem a presença deste microrganismo os valores de listeria são consideravelmente mais elevados (cerca de 2 log ufc/g). Portanto, quando se adicionou glúcidos fermentáveis ao ensaio experimental (com/sem vinho), verificou-se a diminuição dos valores de contagem do patogénico que apresentavam uma diferença significativa ($p < 0,05$) e os valores estão compreendidos entre cerca de 1 e 3 log ufc/g, sendo os responsáveis pelo decréscimo verificado no uso de culturas de arranque de *L. sakei*, pois, nos casos de ausência os valores da contagem do microrganismo patogénico são mais elevados, com a exceção das 16h, em que em condições de ausência de vinho e com a adição de glucose/lactose, a contagem exibida para o ensaio controlo no início é inferior ao que se verifica nas estirpes de *L. sakei* Ls-Ch- 1340 e *L. sakei* DSM 6333.

No entanto, tanto nos ensaios com glúcidos como nos sem glúcidos, o efeito do vinho é determinante, pois aos 3 e 7 dias de incubação observaram-se valores de contagem média para a *Listeria* entre os 3 e os 5 log ufc/g. Por sua vez, as amostras tratadas com vinho apresentam valores médios inferiores às não tratadas (com Glu+Lac), como se pode verificar aos 3 dias em que os valores médios são de $3,43 \pm 0,98$ e $4,74 \pm 0,31$, respectivamente, o que equivale a cerca de 1,3 log ufc/g de diferença entre as duas amostras.

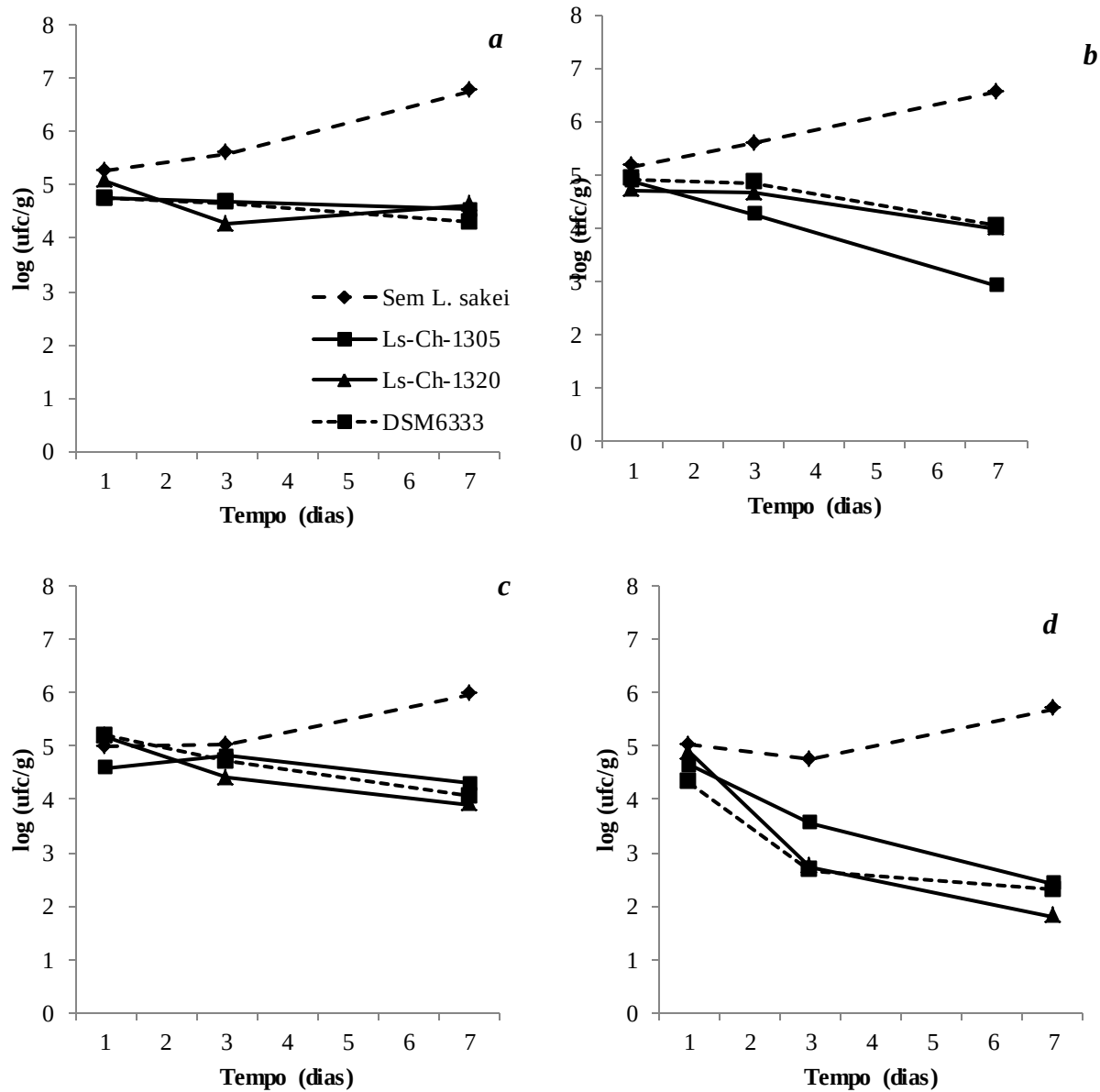


Figura 4.2. Evolução da contagem de *L. monocytogenes* ao longo do ensaio. **a** sem vinho e sem glicídios; **b** com de vinho e sem glicídios; **c** sem vinho, com glicídios, **d** com vinho e com glicídios.

5. Conclusões

A avaliação da atividade antagonista de *L. sakei* e de *L. plantarum* isolados de enchidos tradicionais demonstrou que neste ecossistema microbiano é possível encontrar estirpes muito interessantes do ponto de vista da inibição de bactérias patogénicas, nomeadamente, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, de entre outros.

A produção de BLIS por estirpes selecionadas de *L. sakei* ativas contra *L. monocytogenes* foi influenciada pelo pH do meio de cultura, pelo seu teor em sal e pela temperatura de incubação. O pH de 5,5 foi o mais eficaz para a produção de BLIS, o que é muito interessante do ponto de vista tecnológico, pois é um valor próximo do encontrado ao longo do fabrico de enchidos. O teor em sal de 2% foi o mais favorável a produção de BLIS. Por cada incremento de 2% testado, a produção é reduzida de forma significativa. Este aspeto também vai de encontro ao grande potencial que as estirpes de *L. sakei* representam para ser usadas em culturas de arranque para enchidos, pois 2% é um teor que se encontra em muitos enchidos prontos, e maior do que aquele que se encontrará na fase inicial do processo de fabrico. O teor máximo testado (6%), ainda que pontualmente seja encontrado em enchidos, dificilmente é alcançado nestes produtos, principalmente quando se pretende fazer produtos de qualidade diferenciada.

A utilização de vinho em meio de cultura para testar a sua eventual interação com as BLIS produzidas por *L. sakei* contra *L. monocytogenes* não evidenciou qualquer efeito, provavelmente porque o método usado foi qualitativo e não quantitativo.

A utilização de *L. sakei* em condições próximas das do fabrico de enchidos, usando uma preparação de carne picada com uma formulação semelhante à de chouriço mostrou ser útil no controlo de *L. monocytogenes*. A associação da cultura de *L. sakei* com vinho, glúcidos fermentáveis, ou com ambos mostrou-se ser mais eficaz do que a utilização isolada das culturas de arranque. Em qualquer circunstância, e considerando que este chouriço é um produto experimental, pois foi incubado em sacos de polietileno para prevenir a secagem, nas amostras sem cultura de arranque a contagem de *L. monocytogenes* aumentou, ao contrário do que se observou quando se adicionou uma cultura de arranque de *L. sakei*, em que se observou uma redução da sua contagem. O comportamento de *Salmonella* spp. foi genericamente semelhante ao de *L. monocytogenes*, ainda que o efeito da utilização de culturas de arranque não fosse tão claro, pelo que efeito inibitório foi mais evidente em *Listeria monocytogenes*.

A utilização de culturas de arranque de *L. sakei* configura-se muito interessante para a segurança sanitária do chouriço seco cru, particularmente no que se refere ao controlo de *L. monocytogenes*. A sua utilização com o vinho usado para temperar resulta num controlo reforçado do microrganismo patogénico.

6. Referências Bibliográficas

- Aasen, I. M., Markussen, S., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L., e Naterstad, K. (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1-2), 35–43.
- Abee, T., Krockel, L., Hill, C. 1995. Bacteriocins: mode of action and potential in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology* 28: 169-85
- Abrams, D., Barbosa, J., Albano, H., Silva, J., Gibbs, P. a., e Teixeira, P. (2011). Characterization of bacPPK34 a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* strain K34 isolated from “Alheira.” *Food Control*, 22(6), 940–946.
- Abriouel, H. (2003). A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 599–
- Ahn, D. e Min, B. (2007). Packaging and storage. In: Toldrá, F, Hui, Y., Astiasarán, I., Nip, W., Sebranek, J., Silveira, E., Stahnke, L. e Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Blackwell Publishing. Oxford
- Almeida, I. F. . (2009). *Caracterização Preliminar do Microbiota de Enchidos Tradicionais Portugueses Embalados em Atmosferas Protectoras*. Universidade Técnica de Lisboa.
- Alves, V. F., Martinez, R. C. R., Lavrador, M. a S., e De Martinis, E. C. P. (2006). Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. *Meat Science*, 74(4), 623–7
- Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1 - Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* 17:454–61.
- Andrés, A, Barat, J., Grau, R. e Fito, P. (2007). Principles of drying and smoking. In: Toldrá, F, Hui, Y., Astiasarán, I., Nip, W., Sebranek, J., Silveira, E., Stahnke, L. e Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing
- Anónimo: FSIS - Food Safety Inspection Service - Safe Practices for Sausage Production (Course Manual) (1999). U. S. Department of Agriculture (USDA).
- Axelsson, L. 1993. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In *Lactic acid bacteria*, ed. Salminen, S. and von Wright, A., pp. 1-63. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Bacus, J. 1986. Fermented meat and poultry products. In *Advances in meat research*, ed. Pearson, A. M. and Dutson, pp. 123-61. Westport, Connecticut: AVI publishing Co., Inc.
- Baird-Parker, A.-C. 1983. Ácidos orgânicos. In *Ecologia microbiana de los alimentos 1. Factores que afectan a supervivencia de los microorganismos en los alimentos*, ed. ICMSF, pp. 132-42. Zaragoza: Acribia.

- Barocco, P., Y. Berger, D. Chansac, M. Cottenceau, P. Durand, J-C. Frentz, J. Giron, J. Guerin, B. Jacquet, A. Juillard, M. Monge, M. Pinel, P. Poterre, J. Sirami, G. Solignat e P. Zert, 1990. L'encyclopédie de la charcuterie, 3 -ème édition, Soussana.
- Barreto, A. S., Ferreira, M., Ouakinin, J., Ribeiro, A. M. R., 1994. Portuguese chorizo - a traditional intermediate moisture food. *40th International Congress of Meat Science and Technology*, The Hague, Netherlands. S-VIA.31.
- Berthier, F., Ehrlich, S., 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiology Letters* 161, 97-106.
- Blom, H. et al. A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 38, n. 2-3, p. 103-109, Sept. 1997.
- Caplice, E., Fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50: 131-49
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., e Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3), 483–99.
- Castro, M. P., Palavecino, N. Z., Herman, C., Garro, O. a, e Campos, C. a. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*, 87(4), 321–9
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernandez, P.E., Holo, H.,
- 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143,2287–2294.
- Chamba, J. F., Duong, C., Fazel, A., Prost, F. 1994. Partie III. Sélection, propagation et conservation des ferments. Chap. III-2: Sélection des souches de bactéries lactiques. In *Bactéries Lactiques*, ed. Roissart, H. and Luquet, F. M., Vol. 1, pp. 499-521. Uriage: Lorica.
- Cintas, L.M.; Casaus, P.; Holo, H.; Hernandez, P.E.; Nes, I.F.; Håvarstein, L.S. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.*, 180: 1988-1994
- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernández, P.E., 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International* 7, 281– 305
- Cocolin, L., e Rantsiou, K. (2007). Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(6), 1403–11.
- Cocconcelli, P.S., C. Fontana. 2008. Characteristics and applications of microbial starters in meat fermentations. In *Meat Biotechnology*. Ed. Toldrá, F. Springer Science, Business Media, LLC, pp. 129-148
- Colaço-do-Rosário CM, Patarata L, Esteves A, Silva JA. 2000. Salsicharia tradicional transmontana: Caracterização, monitorização e experimentação da tecnologia artesanal. Relatório final do projecto PAMAF 3056. UTAD, Vila Real.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*. Volume 78
- Correia, A. A. D., Correia, J. H. D. 1985. *Bioquímica Animal*, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian

- Coventry, M. J., Gordon, J. B., Wilcock, A., Harmark, K., Davidson, B. E., Hickey, M. W., Hillier, A. J., Wan, J. 1997. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. *Journal of Applied Microbiology* 83: 248-58
- Dainty, R., Blom, H. 1995. Flavor chemistry of fermented sausages. In *Fermented meats*, ed. Campbell-Platt, G. and Cook, P. E., pp. 176-93. Suffolk: Blackie Academic and Professional.
- D'Aoust, J. 1997. *Salmonella* Species. In *Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers*, ed. Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J. Washington: ASM Press. 129-158.
- Deegan, L.H.; Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, 16: 1058-1071.
- De Martinis, E. C. P., e Freitas, F. Z. (2003). Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. *Food Control*, 14(3), 197–200.
- Diez, J., Patarata, L. (2013). Behavior of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Chouriço de Vinho, a dry fermented sausage made from wine-marinated meat. *Journal of Food Protection*. 76:588-94.
- Dortu, C., Huch, M., Holzapfel, W. H., Franz, C. M. A. P., e Thonart, P. (2008). Anti-listerial activity of bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 and *Lactobacillus sakei* CWBI-B1365 on raw beef and poultry meat. *Letters in Applied Microbiology*, 47(6), 581–586.
- Earnshaw, R. G. 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In *The lactic acid bacteria; The lactic acid bacteria in health and disease*, ed. Wood, B. J. B., Vol. 1, pp. 211-32. Glasgow: Elsevier Applied Science.
- Essid, I., Medini, M., e Hassouna, M. (2009). Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science*, 81(1), 203–8.
- Europeu, P., Uni, C. D. A., Ofi-, J., e Oficial, J. (2004). Regulamento CE nº853/2004, (8), 22–82.
- Estévez, M., Morcuende, D., Ventanas, J., Ventanas, S.,(2007). Ripened Meat Products. Mediterranean Products. In: Toldrá, F, Hui, Y., Astiasarán, I., Nip, W., Sebranek, J., Silveira, E., Stahnke, L. e Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing
- Feiner, G. (2006). Raw fermented salami Meat products handbook. In: Feiner, G. Meat products Handbook Practical Science and Technologic. Reino Unido: Woodhead Publishing Limited
- Forsythe, S. J. (2002). Microbiologia da Segurança Alimentar. Artmed Editora. Porto Alegre
- Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzapfel, W., 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4385–4389.
- Fraqueza, M. J. (2003). La Charcuterie Traditionelle Portugaise. Les Salaisons Portugaise. Compte-rendu du 7ème rencontres agroalimentaires du grand rodez “Les Salaisons du sud de L’Europe”. Rodez, France
- Fraqueza, M. J. e Patarata, L. (2006). Recomendações Práticas de Higiene para enchidos tradicionais fermentados e secos. Guia Prático de aulas. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária

- Galvez, A., Lopez, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E., e Omar, N. Ben. (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), 125–52.
- García-Varona, M., Santos, E. M., Jaime, I., e Rovira, J. (2000). Characterisation of Micrococcaceae isolated from different varieties of chorizo. *International Journal of Food Microbiology*, 54, 189–195.
- Gong, H.S., X.C. Meng, H. Wang. 2010. Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China. *Food Control*. 21: 89-96
- Goutefongea, R. 1988. La salaizon. In *Technologie de la vaine et des produits carnés*, ed. Girard, J. P., pp. 125-150. Paris: Tec Doc - Lavoisier, INRA.
- Gøtterup, J., Olsen, K., Knøchel, S., Tjener, K., Stahnke, L. H., e Møller, J. K. S. (2008). Colour formation in fermented sausages by meat-associated staphylococci with different nitrite- and nitrate-reductase activities. *Meat Science*, 78(4), 492–501.
- Hammes, W. P., Hertel, C. 1998. New developments in meat starter cultures. *Meat Science* 49: S125-S138
- Hartmann, H. A., Wilke, T., e Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), 192–9
- Heng, N.C.K., P.A. Wescombe, J.P. Burton, R.W. Jack, J.R. Tagg. 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Eds. Riley, M.A, M.A. Chavan. Springer-Verlag, pp. 45-92.
- Holzapfel, W. H., Geisen, R., Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24: 343-62
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T., 2003. Functionality of enterococci in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 223–233.
- Incze, K. (1998). Dry fermented sausages. *Meat Science*.
- Inês, A., Tenreiro, T., Tenreiro, R., Mendes-Faia, A. (2008), Revisão: As bactérias do ácido láctico do vinho – Parte I, *Ciência Técnica Vitivinícola* 23, 81-96.
- Jablonsky, L. M. e Bohach, G. A. 1997. *Staphylococcus aureus*. In *Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers*, ed. Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J., pp. 353- 375. Washington: ASM Press.
- Jack, R. W., Tagg, J. R., Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews* 59: 171-200
- Johnson, J.L., Doyle, M.P., Cassens, R.G., 1990. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. In meat and meat products: a review. *Journal Food Protection*. 53, 81-91
- Jones, R. J., Hussein, H. M., Zagorec, M., Brightwell, G., e Tagg, J. R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology*, 25(2), 228–34.
- Jung G. (1991). Lantibiotics- ribossomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and $\alpha\beta$ - didehydroamino acids. *Angewandte Chemie International (English edn)* 30: 1501-1068
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 209–224

- Kang, D. H., Fung, D. Y. 1999. Effect of diacetyl on controlling *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation. *Journal of Food Protection* 62: 975-79
- Khan, M.I., M.S. Arshad, F.M. Anjum, A. Sameen, Aneeq-ur-Rehman, W.T. Gill. 2011. Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. *Food Research International*. 44: 3125-3133.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12: 39-86
- Lechowich, R. H. - Microbiologia de la carne. *Ciência de la carne y de los productos carnicos*. Ed. J. F. Price e Schweigert, Acribia, Zaragoza, Espana, 235-295, 1976
- Leistner, L., Rodel, W. 1976. Inhibition of micro-organisms in food by water activity. In *Inhibition and inactivation of vegetative microbes*, ed. Skinner, F. A., pp. 219-37. London: Academic Press
- Leistner, L. 1992. The essentials of producing stable and safe raw fermented sausages. In *New Technologies for meat and meat products. Fermentation and starter cultures; Muscle enzymology and meat ageing; Quality control systems*, ed. Smulders, F. J., Toldra, F., Flores, J., and Prieto, M., pp. 1-19. Utrecht: ECCEAMST, AUDET Tijdschriften
- Leroy, F., e De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science Technology*, 15, 67–78
- Leroy, F., Verluyten, J., e De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 106(3), 270–85
- Leroy, S., Giammarinaro, P., Chacornac, J.-P., Lebert, I., e Talon, R. (2010). Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small-scale processing units. *Food Microbiology*, 27(2), 294–301.
- Linares , M.B., Garrido, M.D., Martins, C., Patarata, L. 2013 Efficacies of Garlic and *L. sakei* in Wine-Based Marinades for Controlling *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in *Chouriço de Vinho*, a Dry Sausage Made from Wine-Marinated Pork. *Journal Of Food Science*, 78, 719-724.
- Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews* 7: 149-63
- Line JE, Svetoch EA, Eruslanov BV, Pereygin VV, Mitsevidh EV, Mitsevidh IP, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS, Siragusa GR, Stern NJ (2008) Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1094–1100
- Liepe, H. U., Pfeil, E., Porobic, R. 1990. Influence of sugars and bacteria on dry sausage souring. *Fleischwirtschaft* 70: 189-92
- Lucke, F. K. 1992. Prospects for the use of bacteriocins against meat-borne pathogens. In *New Technologies for meat and meat products. Fermentation and starter cultures; Muscle enzymology and meat ageing; Quality control systems*, ed. Smulders, F. J., Toldra, F., Flores, J., and Prieto, M., pp. 37-52. Utrecht: ECCEAMST, AUDET Tijdschriften.
- Lucke, F. K. 1986. Microbiological process in the manufacture of dry sausage and raw ham. *Fleischwirtschaft* 66: 1505-09

- Lucke, F.K. 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science* 56: 105-15.
- Maqueda M, Galvez A, Bueno MM, Sanchez-Barrena MJ, Gonzalez C, Albert A, Rico M, Valdivia E (2004) Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr Prot Pept Sci*:399–416
- Martins, C. (1984). Salsicharia tradicional: Perspectivas futuras. *Indústria Alimentar*.
- Melo, R. S., Palminha. M., Santos, C. 1991. *Relatório: Estudo da salsicharia tradicional de Trás-os-Montes*. Laboratório Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares.
- Messi, P., M. Bondi, C. Sabia, R. Battini, G. Manicardi. 2001. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *International Journal of Food Microbiology*. 64: 193-198.
- Mills, S., C. Stanton, C. Hill, R.P. Ross. 2011. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2: 299-329.
- Mishra, C., Lambert, J., 1996. Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asia Pacific. Journal Clinical Nutrition*:5: 20-24
- Moll, G. N., Konings, W. N., e Driessen, a J. (1997). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76(1-4), 185–98
- Montel, M.C., Talon, R., Fournaud, J., Larpent, J.P. 1994. Partie IV. Transformation de produits animaux. Chap. IV-7: Fonctions de bactéries lactiques dans les produits carnés. In *Bactéries Lactiques*, ed. Roissant, H. and Luquet, F.M., vol. 2, pp. 183-91.
- Montel, M.C., Masson, F., Talon, R. 1998. Bacterial role in flavor development. *Meat Science* 49: S111-S123.
- Montville, T. J., e Kaiser, A. (1993). Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins. In D. G. Hoover e L. R. Steenson (Eds.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria* (pp. 1–22). New York: Academic Press.
- Montville, T. J., Winkowski, K., e Ludescher, R. D. (1995). Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *International Dairy Journal*, 5, 797–814.
- Montville, T. J., e Winkowski, K. (1997). Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, e T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers* (pp. 557–577). Washington DC: ASM Press.
- Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 1–24.
- Mombelli, B., Gismondo, M.R. The use of probiotics in medical practice. *Int. Antimicrobiol. Ag.*, v.16, n.4, p.531-6, 2000.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H. (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, seventh ed. Washington, DC, ASM Press, pp. 297–305.
- Nes, I. E., Diep, D. B., H, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., e Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria, (Table 1), 113–128.

- Nettles, C. G., Barefoot, S. F.: Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Protection*. 56, 338-358 (1993).
- NP 589 (2008). Norma Portuguesa para Chouriço de carne: Definição, classificação, características e acondicionamento. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- O'Sullivan, L., Ross, R. P., e Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84(5-6), 593-604
- Patarata, L. (1995) – Avaliação de parâmetros de conservação (actividade da água e pH) e pesquisa de *Staphylococcus aureus* em produtos de salsicharia tradicional. Protocolo de um trabalho prático. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 25 pp.
- Patarata, L.A.; 2002. "Caracterização e Avaliação da Aptidão Tecnológica de Bactérias do Ácido Láctico e Micrococcaceae em Produtos de Salsicharia. Efeito da sua utilização em culturas de arranque e de formulação acidificante no fabrico de linguiça tradicional transmontana". Dissertação para obtenção do grau Doutor em Ciência Alimentar. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Patarata, L., Novais, M., Rua-Pinto, R., Esteves, A. e Martins, C. (2005). Influence of Wine, Nitrite and Lactic Acid Bacteria on the Behavior of Food Poisoning Bacteria in Model Sausages. *51st International Congress of Meat Science and Technology*. 5-12 August, Baltimore, Maryland, USA, Proceedings, 65.
- Pearson, A.M., 1994. La funcion muscular y los câmbios postmortem. In *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Ed- Price,, J.F. e Schweigert, B.S., Acribia, Zaragoza. 139-173.
- Peres, F. (2000). Tecnologia dos produtos cárneos – Aulas práticas. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco
- Petaja, K. e Puolane, E., 2007.. Meat Fermentation Worldwide: History and Principles. Principles of meat fermentation In: Toldrá, F, Hui, Y., Astiasarán, I., Nip, W., Sebranek, J., Silveira, E., Stahnke, L. e Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing
- Prandl, O., Fischer, A., Shmidhfer, T., Sinell, H. (1981). *Tecnologia e higiene de la carne* (Acribia., p. 854). Zaragoza. Espanha.
- Poeta P, Igrejas G, Costa D, Sargo R, Rodrigues J, Torres C (2008). Virulence factors and bacteriocins in faecal enterococci of wild boars. *J Basic Microbiol* 48:385-392
- Rahman, M. S., e Labuza, T. P. (1999). Water activity and food preservation. In M. S. Rahman (Ed.), *Handbook of food preservation* (pp. 339-382). New York: Marcel Dekker.
- Ramon, D., Molina, I., Flores, J. 1992. Development of microbial cultures as starters for spanish dry-cured meat products. In *New Technologies for meat and meat products. Fermentation and starter cultures; Muscle enzymology and meat ageing; Quality control systems*, ed. Smulders, F. J., Toldra, F., Flores, J., and Prieto, M., pp. 53-69. Utrecht: ECCEAMST, AUDET Tijdschriften
- Ravys, F., Vuyst, L. De, e Leroy, F. (2012). Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 356-367
- Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P. G., Cocconcelli, P. 1998. Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 84: 1043-49

- REGULAMENTO (UE) N.º 1129/2011 DA COMISSÃO de 11 de Novembro de 2011
- Ribeiro, M., Martins, C. 1995. A tradição já não é o que era dantes. A valorização dos produtos tradicionais face à mudança social. *Economia e Sociologia* 60: 29-45
- Ricke, S.C., Keeton, J.T., 1997. Fermented meat poultry and fish products. In food Microbiology- Fundamentals and frontiers, ed. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J., pp. 610-28. Washington: ASM Press
- Riley, M. A., Wertz, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 56, p. 117-137, 2002
- Riley, M.A, M.A. Chavan. 2007. Introduction. In Bacteriocins: Ecology and Evolution. Eds. Riley, M.A, M.A. Chavan. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 1-3.
- Rocourt, J. e Cossart, P. 1997. *Listeria monocytogenes*. In *Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers*, ed. Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J., pp. 337- 352. Washington: ASM Press.
- Rodríguez, J. M., Martínez, M. I., e Kok, J. (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 91–121
- Rubin, H.E., (1978). Toxicological model for two acid-system. Appl. Environ. Microbiol. 36: 623-624
- Russell, J. B. 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *Journal of Applied Bacteriology* 73: 363-70
- Sabia, C., de Niederhäusern, S., Messi, P., Manicardi, G., e Bondi, M. (2003). Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages (“cacciatore”). *International Journal of Food Microbiology*, 87(1-2), 173–179.
- Sablani, S., Kasapis, S. e Rahman, M. (2007). Evaluating water activity and glass transition concepts for food stability. *Journal of Food Engineering*. Volume 78
- Schillinger, U., Lucke, F. K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1901-6
- Schmidt, S. J., e Fontana, A. J. (n.d.). E Water Activity Values of Select Food Ingredients and Products, 2, 407–420.
- Siegmundt, H., Bjorn, R. K., Jakobsen, M. 2000. Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2330-35
- Simonetti, P., Cantoni, C. e Bernardi, G., (1982). Colour loss in cooked sausages. *Technologie Alimentari*. 5, 34-5.
- Skandamis, P., Nychas, G-J.E., 2007. Biological and Chemical Safety of Fermented Meat Products .Pathogens: Risks and Control. In: Toldrá, F, Hui, Y., Astiasarán, I., Nip, W., Sebranek, J., Silveira, E., Stahnke, L. e Talon, R. – Handbook of fermented meat and poultry. Oxford: Blackwell Publishing
- Slavica, V.-M., D., O., B., V., Branka, B., Marija, S., e L., T. (2010). Antimicrobial properties of indigenous *Lactobacillus sakei* strain. *Acta Veterinaria*, 60(1), 59–66.
- Sparo, M., Nuñez, G. G., Castro, M., Calcagno, M. L., García Allende, M. a, Ceci, M., Manghi, M. (2008). Characteristics of an environmental strain, *Enterococcus faecalis* CECT7121, and its effects as additive on craft dry-fermented sausages. *Food Microbiology*, 25(4), 607–15.

- Stamer, J. R. (1979) - *Food Technology*, chapter The lactic acid bacteria: microbes of diversity, pp. 60-65.
- Sorrells K M, Enigl D C, Hatfield J R. Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot.* 1989;52:571–573.
- Sousa, M.C., Ribeiro, A. (1997). Chouriço de Carne Português: tecnologia da produção e caracterização química, microbiológica e imunológica. *Revista Alimentar*
- Suma, K., Misra, M. C., e Varadaraj, M. C. (1998). Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *International Journal of Food Microbiology*, 40(1-2), 17–25.
- Tagg, J. R., Dajani, a S., e Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40(3), 722–56
- Talon, R., I. Lebert, A. Lebert, S. Leroy, M. Garriga, T. Aymerich, E. H. Drosinos, E. Zanardi, A. Ianieri, M. J. Fraqueza, L. PATARATA and A. Lauková. 2007. Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1. Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Sci.* 77:570–579.
- Talon R., I. Lebert , A. Lebert , S. Leroy , M. Garriga, T. Aymerich, E.H. Drosinos, E. Zanardi, A. Ianieri, M.J. Fraqueza, L. Patarata, A. Laukova., 2012. Microbial ecosystem of traditional dry fermented sausages in Mediterranean countries and Slovakia. , In: *Mediterranean Ecosystems: Dynamics, Management and Conservation*. Williams, G.S. (Ed), Nova Science Publishers Inc., Hauppauge NY, p. 115.127.
- Tichaczek, P. S., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Vogel, R. F., Hammes, W. P. 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. *Systematic and Applied Microbiology* 15: 460-68
- Todorov, S. D. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus Plantarum*- Production, Genetic organization and Mode of action- Class I: Lantibiotics, , 209–221.
- Todorov, S. D., Vaz-Velho, M., de Melo Franco, B. D. G., e Holzapfel, W. H. (2013). Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from salpicão, a fermented meat product from North-West of Portugal. *Food Control*, 30(1), 111–121.
- Turgis, M., Stotz, V., Dupont, C., Salmieri, S., Khan, R. a., e Lacroix, M. (2012). Elimination of *Listeria monocytogenes* in sausage meat by combination treatment: Radiation and radiation-resistant bacteriocins. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(8), 1185–1188.
- Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G., e Cocolin, L. (2006). Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. *International Journal of Food Microbiology*, 110(3), 232–9
- Vasilopoulos, C., Ravyts, F., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L., e Leroy, F. (2008). Evaluation of the spoilage lactic acid bacteria in modified-atmosphere-packaged artisan-type cooked ham using culture-dependent and culture-independent approaches. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1341–53