



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências Exactas

**Aplicação de conservantes alimentares para  
controlo da contaminação por *Listeria spp.* e  
bolores em queijos**

**Sandrina Isabel Borges Moura**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Bioquímica**

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Dr<sup>a</sup> Patrícia Dinis

Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Beira - Idanha-a-Nova, CRL

Co-orientador: Prof. Doutor António Mendonça

Universidade da Beira Interior

**Covilhã, Junho de 2011**



# Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa - Idanha-a-Nova, CRL pela oportunidade que me deram em realizar todo o projecto no laboratório da fábrica e também por todo o material que me disponibilizaram.

Agradeço também aos meus orientadores, Dr<sup>a</sup> Patrícia Dinis e Professor Doutor António Mendonça, pela orientação, disponibilidade, partilha de opiniões e ideias.

Não poderia deixar de agradecer aos meus pais e irmã pela possibilidade que me deram para realizar este mestrado, por me terem ouvido com paciência, aconselharem e darem força nos momentos de desânimo, o meu muito obrigada.

Por último, à Universidade da Beira Interior.



Declaro que todos os dados presentes nesta tese são da minha inteira responsabilidade.

---

(Sandrina Isabel Borges Moura)



## Resumo

A *Listeria spp.* é um contaminante em queijos curados produzidos com leite cru. Os ácidos orgânicos e os seus sais são conservantes comumente utilizados na indústria alimentar. Neste trabalho foi testada a actividade de ácido láctico; ácido acético; sorbato de potássio e acetato de sódio, sobre o microrganismo indicador *Listeria innocua* por não ser patogénico. Foi estudado o efeito da concentração dos conservantes (0,5-5% v/v) e pH do meio de cultura no intervalo 4 a 8, através da metodologia CCD (Central Composite Design). O crescimento bacteriano foi monitorizado por turbidimetria. Verificou-se que acima de 1% (v/v) de ácido láctico e ácido acético ocorreu uma inibição do crescimento da *Listeria innocua* superior a 90%. Para determinar se os conservantes apresentavam actividade bactericida, foram repetidos os ensaios em placa com meio OCLA (Oxoid Chromogenic Listeria Agar) a 37°C. Confirmou-se que o ácido acético tem propriedades bactericidas contra a *Listeria innocua* a partir de 1% (v/v) com uma redução de 5,0log UFC/ml<sup>2</sup> enquanto que o ácido láctico inibe a partir de 2% (v/v) com uma redução de 3,5log UFC/ml<sup>2</sup>. Quanto aos sais os resultados obtidos não foram favoráveis. Após este estudo foi seleccionado o ácido acético para testar a sua eficácia na redução da *Listeria innocua* e bolores nos queijos, comparativamente ao conservante Delvocoat usado na fábrica. Concluiu-se que a aplicação de 5% de ácido acético na superfície dos queijos permite reduzir a contaminação por *Listeria innocua* mas não por bolores.

## Palavras- Chave

Ácido acético, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, queijo.



## Abstract

*Listeria spp.* is a contaminant in cheeses made with raw milk. Organic acids and their salts are preservatives commonly used in food industry. In this study we tested the activity of lactic acid, acetic acid, potassium sorbate and sodium acetate on the non-pathogenic *Listeria innocua*. The effect of preservatives concentration (0.5-5% v / v) and the pH of culture medium in the range 4-8 were studied using CCD (Central Composite Design). Bacterial growth was monitored by turbidimetry. It was found that above 1% (v / v) of lactic acid and acetic acid there was a growth inhibition of *Listeria innocua* above 90%. To determine whether the preservative showed bactericidal activity, the tests were repeated in an OCLA medium (Oxoid Chromogenic *Listeria* Agar) at 37 ° C. It was confirmed that acetic acid has antibacterial properties against *Listeria innocua* from 1% (v / v) with a reduction of 5.0 log UFC/ml<sup>2</sup> while lactic acid inhibits from 2% (v/v) with a reduction of 3.5 log UFC/ml<sup>2</sup>. As for the salts the results were not favorable. After this study acetic acid was selected to test its effectiveness in reducing *Listeria innocua* and molds in cheeses, compared with a preservative Delvocoat used in the factory. It was concluded that the application of 5% acetic acid on the surface of the cheese can reduce the contamination by *Listeria innocua* but not mold.

## Keywords

Acetic acid, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, cheese.



# Índice

	Página
Agradecimentos	iv
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de figuras	xiv
Lista de tabelas	xvii
Lista de acrónimos	xix
Capítulo I - Revisão Bibliográfica	
1.1- Impacto Mundial	1
1.2- <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.2-1. O organismo	2
1.2-2. Crescimento	2
1.2-3. Classificação	3
1.3- Características da listeriose	4
1.4- Processo infeccioso	6
1.5- Ambiente	6
1.6- <i>Listeria innocua</i>	7
1.7- Bolores	7
1.8- Conservantes	8
1.8-1. Ácidos orgânicos	8
1.8-1.1. Ácido acético	10
1.8-1.2. Ácido láctico	11

1.8-1.3. Ácido sórbico/ sorbato de potássio	11
1.9- Leite	11
1.9-1. Composição do leite	12
1.9-2. Elementos estruturais	14
1.9-3. Microflora de leite cru	15
1.9-4. Aspectos relevantes da composição do leite no fabrico de queijo	16
1.10- Queijo	17
1.10-1. Etapas do processo de fabrico do queijo	19
1.10-2. Microbiologia do queijo	20
1.10-3. Culturas “iniciadoras”	21
1.11- Métodos	22
<b>Capítulo II - Materiais e Métodos</b>	
2.1- Materiais e métodos	23
2.2- Parte experimental	24
2.2-1. Cultura	24
2.2-2. Queijos	25
2.2-3. Design Experimental	25
2.2-4. Efeito dos conservantes na <i>Listeria spp.</i>	26
2.2-5. Efeito da turbidez	26
2.2-6. Contaminação e análises aos queijos	27
2.2-6.1. Solução de contaminação	27
2.2-6.2. Análise da solução de contaminação	27
2.2-6.3. Contaminação	27
2.2-6.4. Análise à casca do queijo	27
2.2-6.5. Solução com o conservante	27

2.2-7. Análise Sensorial/ Prova de queijos	28
<b>Capítulo III- Resultados e Discussão</b>	
3.1- <i>Listeria innocua</i> vs <i>Listeria monocytogenes</i>	29
3.2- Efeito do pH no crescimento de <i>Listeria spp.</i>	30
3.3- Análise dos conservantes no Bioscreen	31
3.4- Efeito bactericida	35
3.5- Análise em queijos	38
3.6- Novos testes no Bioscreen	42
3.7- Análise sensorial/ Prova de queijo	46
<b>Capítulo IV</b>	
4.1- Conclusões	47
4.2- Perspectivas Futuras	48
<b>Bibliografia</b>	49



# Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Colónias <i>Listeria monocytogenes</i> em meio OCLA	2
<b>Figura 2.</b> Exemplo da composição do leite e do queijo e da transferência dos componentes do leite para queijo	17
<b>Figura 3.</b> Esquema das mudanças (bio)químicas e físicas que ocorrem durante a transformação do leite em queijo	19
<b>Figura 4.</b> Curvas de crescimento da <i>Listeria innocua</i> e da <i>Listeria monocytogenes</i>	29
<b>Figura 5.</b> Efeito do pH no crescimento da <i>Listeria innocua</i>	30
<b>Figura 6.</b> Efeito do pH no crescimento da <i>Listeria innocua</i>	31
<b>Figura 7.</b> Efeito do pH no crescimento da <i>Listeria monocytogenes</i>	31
<b>Figura 8.</b> Efeito do sorbato de potássio no crescimento de <i>listeria innocua</i>	32
<b>Figura 9.</b> Efeito do acetato de sódio no crescimento da <i>Listeria innocua</i>	33
<b>Figura 10.</b> Efeito do ácido láctico no crescimento da <i>Listeria innocua</i>	34
<b>Figura 11.</b> Efeito do ácido acético no crescimento da <i>Listeria innocua</i>	35
<b>Figura 12.</b> Efeito do bactericida e fungicida	37
<b>Figura 13.</b> Aspecto dos queijos, inoculados com bolores e <i>Listeria innocua</i>	40
<b>Figura 14.</b> Efeito do ácido acético no crescimento da <i>Listeria innocua</i>	43
<b>Figura 15.</b> Efeito do ácido láctico no crescimento da <i>Listeria innocua</i>	44
<b>Figura 16.</b> Efeito do ácido acético no crescimento da <i>Listeria monocytogenes</i>	45
<b>Figura 17.</b> Efeito do ácido láctico no crescimento da <i>Listeria monocytogenes</i>	46



# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Classificação da <i>Listeria monocytogenes</i> baseada em fingerprinting genómicos e no potencial patogénico	4
<b>Tabela 2.</b> Síndromes clínicas associadas à infecção por <i>Listeria monocytogenes</i>	5
<b>Tabela 3 -</b> Algumas características diferenciais das espécies de <i>Listeria</i>	7
<b>Tabela 4.</b> Influência do pH sobre a quantidade de iões dissociados (%) de ácidos orgânicos fracos	9
<b>Tabela 5.</b> Composição típica do leite nas diversas espécies animais	12
<b>Tabela 6.</b> Composição aproximada do leite	13
<b>Tabela 7.</b> Propriedades dos principais elementos estruturais do leite	14
<b>Tabela 8.</b> Lista de reagentes	23
<b>Tabela 9.</b> Lista dos equipamentos	23
<b>Tabela 10.</b> Lista dos meios de cultura	24
<b>Tabela 11.</b> Combinações de pH e concentração de conservante segundo o CCD	25
<b>Tabela 12.</b> Contagem de <i>Listeria innocua</i> na casca dos queijos tratados	38
<b>Tabela 13.</b> Contagem de <i>Listeria innocua</i> na casca dos queijos tratados	39
<b>Tabela 14.</b> Contagem de bolores na casca dos queijos tratados	39
<b>Tabela 15.</b> Contagem de <i>Listeria innocua</i> na casca dos queijos tratados	41
<b>Tabela 16.</b> Registo de pH ao longo dos dias de maturação dos queijos	41
<b>Tabela 17.</b> Contagem de bolores na casca dos queijos tratados	42



# Lista de Acrónimos

CCD- Central Composite Design

HIV- Vírus imunodeficiência humana

MRD- Solução de recuperação máxima

OCLA- Agar cromogénico de *listeria*

RBC- Agar rcsa de bengala de cloramfenicol

TSB- Caldo peptona de caseína

YE- Extracto de levedura



# Capítulo I - Introdução

## 1.1- Impacto mundial

As doenças causadas pelo consumo de alimentos têm um impacto na economia e saúde pública a nível mundial (Gandhi and Chilindas, 2007).

Nos últimos anos, os padrões alimentares mudaram. Um crescente número de consumidores procura produtos pouco processados. Infelizmente, tem havido um aumento na frequência de surtos de intoxicações associados a alimentos, devido a contaminações microbiológicas (Chollet et al., 2008).

Um microrganismo que é transmitido através dos alimentos é a *Listeria*, que dependendo da espécie pode causar listeriose. Embora a incidência de listeriose na Europa seja baixa, com cerca de 2 a 3 casos/milhão de habitantes/ano, a elevada taxa de mortalidade (até 40%) exige um diagnóstico precoce e uma terapia antimicrobiana apropriada (Aureli et al., 2003).

Em Portugal não há fiscalização para infecções por *Listeria monocytogenes*, e consequentemente não existe registo de listeriose humana associada ao consumo de alimentos (Gameiro et al., 2007). Contudo, evidências indicam que a listeriose humana ocorre em Portugal e em níveis semelhantes aos outros países desenvolvidos (Felício et al., 2007).

## 1.2- *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é um patógeno oportunista de humanos e animais e, identificada a primeira vez como causa de infecção em 1927. Na última década tem sido implicada em vários surtos, e têm surgido casos esporádicos de listeriose atribuídos a alimentos contaminados (Margolles et al., 1998; Adams and Moss, 2008). Estes casos têm estado associados a alimentos pronto-a-comer; a produtos de charcutaria; a doces; a carne congelada; a aves; a produtos do mar; a frutos e produtos vegetais/ hortícolas (Shetty et al., 2006); a leite pasteurizado e produtos lácteos como o queijo produzido a partir de leite não pasteurizado (Makino et al., 2005). A *Listeria* também pode estar associada ao consumo de água (Jay et al., 2005).

A *Listeria monocytogenes* tornou-se um microrganismo de grande preocupação para a indústria alimentar, devido à extensão dos surtos e à elevada taxa de mortalidade, pois a listeriose apresenta sintomas pouco comuns para uma intoxicação alimentar, incluindo a infecção do sistema nervoso central e o aborto (Arqués et al., 2005; Shetty et al., 2006).

### 1.2-1. O organismo

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbica facultativa, psicotrófica, catalase positiva, oxidase negativa e não forma esporos (Apostolidis et al., 2008; Adams and Moss, 2008; Shetty et al., 2006). É uma bactéria pequena (0,4-0,5µm x 0,5-2,0µm) em forma de bastonete que é cultivada a 20-25°C e possui flagelos peritricosos, é também uma bactéria microaeróbia que apresenta diminuição na motilidade (Jeffrey, 2010; Adams and Moss, 2008). Em culturas frescas, as células podem ocorrer isoladamente ou formar cadeias curtas, mas sob condições de stress, como o elevado teor de sal (>5%) e a temperatura (>45°C), as células podem ser alongadas ou formar cadeias longas (Ray and Bhunia, 2008). As colónias aparecem translúcidas com um brilho característico azul-esverdeado (Jeffrey, 2010).

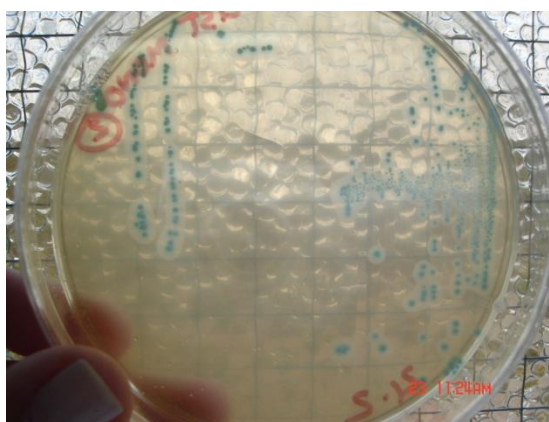


Figura 1- *Listeria monocytogenes* em meio OCLA

### 1.2-2. Crescimento

O potencial crescimento da *Listeria monocytogenes* nos alimentos depende de muitos factores, sendo o mais importante a estirpe específica. Contudo, também depende das condições ambientais a que a estirpe está sujeita e das propriedades intrínsecas dos alimentos como por exemplo: pH; teor de NaCl; actividade da água  $a_w$ ; microflora associada e constituintes antimicrobianos. As propriedades extrínsecas que influenciam o crescimento de *Listeria monocytogenes* são nomeadamente a temperatura e a composição da atmosfera do meio (Skalina and Nikolajeva, 2010). A maioria das bactérias, incluindo a *Listeria monocytogenes*, são normalmente resistentes a pequenas alterações num determinado parâmetro ambiental (Shetty et al., 2006). Contudo na presença de alterações mais acentuadas ocorre a indução de respostas ao stress direccionadas para a sobrevivência e não para o crescimento (Faleiro et al., 2003).

Esta bactéria cresce a temperaturas entre -1,5 e 45°C (sendo a temperatura óptima entre os 35-37°C) (Ryser and Marth, 2007) e num intervalo de pH entre 5 e 9 (Faleiro et al., 2003; Adams and Moss, 2008; Shetty et al., 2006). No entanto o efeito do pH na viabilidade celular

depende de outros factores ambientais e do estado fisiológico do microrganismo (Ryser and Marth, 2007). É também muito tolerante ao sal, sobrevivendo em meios que contêm mais de 20% NaCl. Para além disso, a *Listeria* é dos poucos agentes patogénicos em alimentos que cresce a  $a_w$  inferior a 0,93 (Ray and Bhunia, 2008). Por último, a *Listeria monocytogenes* cresce bem na presença de sais biliares, que são letais para a maioria das bactérias gram-positiva (Shetty et al., 2006).

### 1.2-3. Classificação

Muitos métodos têm sido usados para distinguir diferentes estirpes de *Listeria monocytogenes*. A distinção entre estirpes de *Listeria monocytogenes* é importante para a epidemiologia e na determinação da origem de surtos de listeriose, mas também tem implicações importantes para a compreensão da virulência, pois nem todas as estirpes de *Listeria* são igualmente capazes de causar doença (Shetty et al., 2006).

As espécies patogénicas primárias, como *Listeria monocytogenes*, é representada por 13 serotipos, alguns dos quais são compartilhados pela *Listeria innocua* e *Listeria seeligeri* (Jay et al., 2005). Mais de 90% dos casos de listeriose humana são causados pelos serotipos 1/2a, 1/2b e 4b (Shetty et al., 2006). Em geral, a linhagem 4b é frequentemente associada a surtos, enquanto que as estirpes 1/2 são predominantes em casos esporádicos, pois estão associadas a produtos alimentares (Jay et al., 2005). Contudo, o serotipo 4b sozinho está associado a 50% dos casos de listeriose e, parece estar frequentemente mais associado com a doença fetomaternal do que com a doença sistémica (Shetty et al., 2006).

A *Listeria monocytogenes* pode também ser agrupada em três linhagens distintas (I,II,III) com base nos seus padrões de impressão genética e no potencial patogénico (tabela 1). A linhagem I contém principalmente clones epidémicos e é responsável pela maioria dos surtos, a linhagem II contém clones que são responsáveis pelas doenças humanas esporádicas, e a linhagem III contém clones que raramente causam doenças em humanos, mas pode ser responsável pela listeriose animal (Ray and Bhunia, 2008).

**Tabela 1** - Classificação da *Listeria monocytogenes* baseada em fingerprinting genómicos e no potencial patogénico (dados epidemiológicos) (adaptado de Ray and Bhunia, 2008).

Grupos	Surtos	Potencial patogénico	Serotipos predominantes
Linhagem I	Clones epidémicos e responsáveis pela maioria dos surtos	elevado	1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e
Linhagem II	Casos esporádicos de listeriose	médio	1/2a, 3a, 1/2c, 3c
Linhagem III	Raramente causa doença em humanos	baixo	4a, 4c

### 1.3- Características da listeriose

A listeriose em humanos não é considerada por um só conjunto de sintomas, pois a evolução da doença depende do estado do hospedeiro. As mulheres não grávidas e os indivíduos saudáveis que não estão imunodeprimidos, são altamente resistentes à infecção por *Listeria monocytogenes* (Jay et al., 2005). No entanto, são conhecidas condições que predispõem à listeriose: neoplasias; HIV; alcoolismo; diabetes mellitus e lúpus eritematoso sistémico (Ryser and Marth, 2007); doença cardiovascular; transplantados renais; corticoterapia; mulheres grávidas; idosos; crianças; pacientes que tomam medicamentos imunossupressores (Jay et al., 2005; Shetty et al., 2006).

Os períodos de incubação da doença variam de um a noventa dias com um período típico de incubação de algumas semanas, uma situação que torna difícil ou quase impossível a identificação do veículo alimentar (Adams and Moss, 2008).

São conhecidos dois tipos de listeriose: (a) uma forma invasiva, que pode ser fatal em recém-nascidos, idosos e adultos imunodeprimidos; e (b) a menos comum, que provoca doença gastrointestinal (Jeffrey, 2010).

O mecanismo exacto da gastroenterite não é conhecido; no entanto, estudos epidemiológicos sugerem que esta patologia está geralmente associada a indivíduos saudáveis (Ray and Bhunia, 2008). Na maioria das vezes os sintomas aparecem dentro de 1-7 dias após a ingestão e incluem sintomas de gripe (como febre, vômitos, dores abdominais e diarreia), sonolência e fadiga; porém estes tendem a desaparecer em poucos dias (Shetty et al., 2006; Ray and Bhunia, 2008; Ryser and Marth, 2007). Este tipo de listeriose parece necessitar de doses extremamente elevadas de bactérias (aproximadamente  $10^5$ - $10^9$  bactérias por grama) e está normalmente associada a alimentos contaminados como a carne, queijo, peixe fumado, milho e saladas de arroz (Shetty et al., 2006; Ryser and Marth, 2007).

Em contraste, a listeriose invasiva tem um tempo de latência de três a setenta dias (Jeffrey, 2010). Esta forma de doença está associada a populações imunologicamente alteradas. A dose infectante nessas pessoas é cerca de 100-1000 células (Ray and Bhunia, 2008). Geralmente começa com sintomas leves e semelhantes aos da gripe, incluindo calafrios, fadiga, cefaleias e dores musculares. Em adultos não gestantes, esta pode ser acompanhada por sintomas cada vez mais graves, dependendo do tecido infectado pelas bactérias (Shetty et al., 2006). Normalmente causa meningoencefalite, que é a infecção dos tecidos do cérebro e das meninges, pode causar distúrbios do movimento, mudanças de consciência e paralisia de nervos cranianos. Também são frequentes outras patologias como a meningite, septicemia e infecção sistémica que apresentam sintomas mais generalizados, mas igualmente fatais (Shetty et al., 2006; Ryser and Marth, 2007). Em mulheres grávidas, a mãe é frequentemente assintomática ou tem apenas sintomas muito leves, enquanto que o feto é severamente infectado. Isso pode levar a aborto, partos prematuros, nados mortos ou sepsia nos recém-nascidos (Shetty et al., 2006). A listeriose pode ocorrer a qualquer momento durante a gravidez, mas é mais frequente durante o terceiro trimestre. A maioria dos casos de listeriose na gravidez ocorre em mulheres saudáveis. Mulheres grávidas com múltiplas gestações podem aumentar o risco de listeriose em comparação com gestações únicas (Ryser and Marth, 2007). Bebés infectados que sobrevivem ao parto são muito susceptíveis a terem complicações neurológicas durante a vida (Shetty et al., 2006).

**Tabela 2-** Síndromes clínicas associadas à infecção por *Listeria monocytogenes* (adaptado de Ryser and Marth, 2007).

População	Apresentação clínica	Diagnóstico	Condições predisponentes ou circunstâncias
	Febre, mialgia, diarreia		
<b>Grávidas</b>	Parto prematuro Aborto Nado morto	Sangue ou líquido amniótico	
<b>Recém-nascidos</b>			
<7 dias de idade	Sepsia, pneumonia	Sangue	Prematuridade
>7 dias de idade	Meningite, sepsia	Fluido cefalorraquidiano	
<b>Adultos não gestantes</b>	Sepsia, meningite, infecções	Sangue, Fluido cefalorraquidiano	Imunossupressão, idade avançada
<b>Adultos saudáveis</b>	Diarreia e febre	Cultura de fezes em meio selectivo enriquecido	Possivelmente uma inoculação extensa

#### 1.4- Processo infeccioso

O controlo de *Listeria monocytogenes* no organismo é afectado pelos linfócitos T activados e macrófagos e, portanto, qualquer condição que afecte essas células irá agravar o desenrolar da listeriose (Jay et al., 2005).

Uma vez que a bactéria entra nas células dos mamíferos por fagocitose, nomeadamente através de monócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, eles são libertados por vacúolos ligados à membrana e começam a multiplicar-se. O patógeno utiliza a proliferação da actina para circulação intracelular e difunde-se célula a célula infectando uma vasta gama de tecidos hospedeiros. O fígado é o principal local de infecção, podendo também afectar o cérebro e o feto em mulheres grávidas (Gandhi and Chilindas, 2007; Jeffrey, 2010).

#### 1.5- Ambiente

*Listeria monocytogenes* foi isolada de várias espécies de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e insectos (Shetty et al., 2006). Está amplamente distribuída na natureza e pode ser encontrada na decomposição da vegetação e nos solos, nas fezes de animais, esgoto, silagem e água (Jay et al., 2005). Este microrganismo é detectado em maior número no início da primavera (Shetty et al., 2006).

A natureza extremamente generalizada do organismo no ambiente, o seu crescimento psicotrófico, a resistência ao stress em relação a outros patógenos não esporados (por exemplo: a congelação, o sal e o calor), faz com que seja particularmente difícil de controlar este microrganismo numa ampla variedade de instalações de processamento de alimentos (Jeffrey, 2010).

Devido à tolerância ácida de *Listeria monocytogenes*, este organismo pode estar presente em alimentos com baixo pH, nomeadamente no queijo. Além disso, este tipo de alimento geralmente tem um valor de pH (5,0-5,5), que pode induzir uma resposta tolerante a ácido (ATR), isto é, induz uma resistência a pH mais baixo do que aquele que poderia ser letal (Faleiro et al., 2003).

A fim de eliminar a *Listeria monocytogenes* no processamento de alimentos têm sido amplamente usados desinfectantes e aditivos, nomeadamente nitrito de sódio, lactato de sódio e diferentes ácidos, porém estes podem afectar as qualidades sensoriais do produto (Vescovo et al., 2006; Lundém et al., 2003). Contudo, é difícil eliminar esta bactéria apesar da limpeza e dos tratamentos, pois algumas estirpes de *Listeria monocytogenes* parecem persistir causando contaminação prolongada. Esta bactéria tem mostrado adaptação a compostos de amónia quaternária (QAC) que são amplamente usados na indústria de

transformação alimentar. Os motivos que levam à contaminação persistente não são claros, mas tem sido proposto que adaptação e a resistência de *Listeria monocytogenes* para desinfetantes pode influenciar a sobrevivência do organismo no processamento de alimentos e plantas (Lundén et al., 2003).

### 1.6- *Listeria innocua*

A *Listeria innocua* é representada por dois serotipos (6a/6b) e, é de particular importância porque está estreitamente relacionada com a *Listeria monocytogenes* (tabela 3), e elas são geralmente encontradas nos mesmos alimentos, em diversos ambientes e em amostras clínicas (Chen et al., 2010; Miller et al., 2009; Jay et al., 2005).

Tem sido usada em vários estudos de inativação térmica em substituição da *Listeria monocytogenes*, porque assemelham-se ecologicamente; bioquimicamente; e geneticamente o que causa respostas semelhantes a tratamentos físico-químicos (Miller et al., 2009; Gallo et al., 2007; Chen et al., 2010). Para além disso, a *Listeria innocua* não é patogénica e a presença em alimentos não é perigosa para a saúde humana (Miller et al., 2009).

**Tabela 3** - Algumas características diferenciais das espécies de *Listeria* (adaptado de Jay et al., 2005).

Espécies	Xilose	Lactose	Galactose	Ramnose	Manitol	Hidrolise hipurato	Teste CAMP			Mol% G+C	Serotipos
							S.aureus	R.equi	Beta Hemólise		
<i>L.monocytogenes</i>	-	V	V	+	-	+	+	+	+	37-39	*
<i>L.innocua</i>	-	+	-	+	-	+	-	-	+	36-38	4ab,6a,6b

Nota: v-variável

\*1/2a, b, c; 3a, b, c; 4a, ab, b, c, d, e; "7."

### 1.7- Bolores

Todos os anos, grandes quantidades de alimentos são descartados devido à contaminação e deterioração por fungos (Stratford et al., 2009). Há espécies de fungos que são capazes de causar deterioração em queijos, estando bem adaptados para ambientes com elevado teor de gordura e pH baixo (Basílico et al., 2001).

Embora o crescimento de fungos na superfície ou no interior das diversas variedades de queijo seja essencial para o amadurecimento, o crescimento de fungos geralmente não é desejado. A deterioração por bolores é desagradável visualmente, e pode promover o aparecimento de manchas; odor a mofo; crescimento de hifas e esporulação na superfície do alimento; alteração da textura ou paladar resultante da formação de metabolitos; e produção de

micotoxinas podendo constituir um risco para a saúde (Fernandes, 2009; Stratford et al., 2009). Para além disso, os fungos também são responsáveis pela liquefação do coágulo formado no processo da coalhada na produção de queijo (Fernandes, 2009).

Os bolores normalmente envolvidos na deterioração de queijo incluem membros do género *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Monilia* e *Alternaria* (Fernandes, 2009).

No entanto, para controlo da deterioração de queijos por bolores a higiene nas câmaras de maturação é essencial, sendo necessários rigorosos procedimentos de limpeza para evitar a acumulação de esporos de bolor (Fernandes, 2009). A deterioração pode ser impedida pelo uso de conservantes de ácido fraco, como o ácido sórbico ou ácido acético (Stratford et al., 2009).

## 1.8- Conservantes

### 1.8-1. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são típicos do metabolismo microbiano. Todos os ácidos orgânicos ocorrem naturalmente numa variedade de substratos de origem vegetal e animal e podem, portanto, estar naturalmente presentes como componentes de alimentos devido a processos metabólicos bioquímicos, hidrólise, crescimento bacteriano, ou pela adição directa ou indirecta aos produtos (Theron and Lues, 2011). Sendo também um mecanismo comum no controlo de patogéneos de origem alimentar numa diversidade de produtos alimentares (Miller et al., 2009).

Os ácidos orgânicos são eficazes como conservantes de alimentos, pois para além das suas actividades antimicrobianas inibitórias, eles também agem como acidulantes e assim reduzem o crescimento bacteriano através da redução do pH dos alimentos para níveis que inibem o crescimento bacteriano (Theron and Lues, 2011). Como é o caso da *Listeria monocytogenes*, que é inibida na superfície dos alimentos pela pulverização ou imersão em ácido (Ryser and Marth, 2007).

Esta actividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos é dupla: (i) pela libertação de protões na dissociação reduz o pH extracelular, e (ii) a forma não dissociada do ácido é capaz de se difundir para o interior da célula, afectando o metabolismo celular (Janssen et al., 2007).

A acção antimicrobiana do ácido orgânico fraco é produzido pela combinação de acções de moléculas não dissociadas e de iões resultantes da dissociação. Os microrganismos que são importantes nos alimentos tendem a manter um pH citoplasmático interno entre de 6,5 e 7,0 em acidófilos e 7,5 a 8,0 nos neutrófilos. Quando um ácido orgânico fraco é adicionado a

alimentos, dependendo do pH do alimento; do pK do ácido; e da temperatura, algumas moléculas dissociam-se enquanto outras permanecem não dissociadas. No pH da maioria dos alimentos (pH 5-8), as moléculas de ácido orgânico geralmente permanecem dissociadas; como resultado, a concentração de  $H^+$  no ambiente aumenta, o que interfere com o gradiente de prótons transmembranar nas células microbianas. Para ultrapassar esta situação, as células transportam prótons através de bombas de prótons, que leva ao consumo de energia e à diminuição do pH interno (pHi). As estruturas na superfície da célula: a membrana exterior ou a parede celular; a membrana interior ou a membrana citoplasmática; e o espaço periplasmático estão também expostos à concentração de  $H^+$ . Isso pode afectar negativamente as ligações iónicas das macromoléculas e interferir com as estruturas tridimensionais e com algumas funções relacionadas (Ray and Bhunia, 2008). A  $pH < 5$ , alguns ácidos encontram-se sobretudo na forma não dissociada como podemos verificar na tabela 4, assim concluí-se que a concentração de ácidos orgânicos não dissociados aumenta com a diminuição de pH relativamente ao valor de pKa (Ray and Bhunia, 2008; Ryser and Marth, 2007). Sendo lipofílicos, em função do gradiente de concentração, eles entram livremente através da membrana. Porque o pHi é muito maior que o pK do ácido, as moléculas dissociam-se, libertando prótons e aniões. Alguns aniões (p.ex., acetato e lactato) são metabolizados por vários microrganismos como fonte de carbono, mas se isso não acontecer os aniões são removidos do interior da célula. Estas alterações podem interferir com o transporte de nutrientes e a produção de energia, e por sua vez influenciam o crescimento microbiano. Além disso, o pH baixo pode causar danos reversíveis e irreversíveis em macromoléculas celulares, que pode posteriormente induzir danos subletais bem como danos letais para as células (Ray and Bhunia, 2008).

**Tabela 4-** Influência do pH sobre a quantidade de iões dissociados (%) de ácidos orgânicos fracos (adaptado de Ray and Bhunia, 2008).

Ácido	pK	%dissociada no pH		
		4	5	6
Acético	4,8	15,5	65,1	94,9
Láctico	3,8	60,8	93,3	99,3
Sórbico	4,8	18,0	70,0	95,9

Assim, a actividade antimicrobiana resume-se em (i) inibição, ou seja, a indução antecipada da fase estacionária, e *depois* (ii) na inactivação, isto é, uma diminuição na concentração das células para valores abaixo do limite de detecção tolerados pelo organismo (Janssen et al., 2007).

Como já foi referido, a maioria dos conservantes são ácidos fracos, sendo as suas propriedades antimicrobianas mais eficazes a pH ácido. Os ácidos fracos existem em solução aquosa em equilíbrio dinâmico entre ácidos moleculares e as suas bases conjugadas. Tais equilíbrios são altamente dependentes do pH e a acção antimicrobiana de um ácido fraco como conservante aumenta com a acidez, que parece ser proporcional à concentração de ácido não dissociado (Stratford et al., 2009).

Os ácidos acético e propiónico são mais lipofílicos do que o ácido láctico, logo eles possuem maior eficácia antimicrobiana que o ácido láctico (Ray and Bhunia, 2008).

Uma das características mais importantes dos ácidos orgânicos é que eles têm influência directa sobre o sabor e a qualidade de alguns alimentos (Theron and Lues, 2011).

### 1.8.1-1. Ácido acético

Os ácidos orgânicos, como o ácido acético, são conservantes usados na indústria alimentar, pois apresentam actividade contra um amplo espectro de microrganismos patogénicos que causam deterioração dos alimentos, mesmo a baixas concentrações (Janssen et al., 2007).

O ácido acético é uma das substâncias químicas mais antigas conhecidas pela humanidade e é produzido naturalmente durante a deterioração de frutas e de outros alimentos pela actividade de bactérias acéticas (AAB) (Theron and Lues, 2011).

O ácido acético obtido através da fermentação é usado principalmente no mercado de alimentos (vinagre, conservante de alimentos) (Shetty et al., 2006). Assim, o ácido tem dupla importância: *como conservante* e *como tempero*. É usado como ácido livre, como sais de cálcio e sódio, ou como Na-diacetato, em Ketchup, maionese, legumes ácidos (pickles), pão e outros produtos da panificação (Belitz et al., 2009).

Os organismos actualmente utilizados na sua produção são espécies como a *Saccharomyces cerevisiae*, o *Clostridium* e a *Acetobacter aceti*, sendo esta última comumente encontrada em alimentos, água e solo (Shetty et al., 2006; Theron and Lues, 2011).

Os efeitos antimicrobianos do ácido acético, são praticamente todos atribuídos ao seu efeito sobre o pH, embora a forma não dissociada do ácido aumente sete vezes entre o pH 5 e 6, já o seu efeito antimicrobiano apenas duplica. O logaritmo da constante de dissociação do ác. acético é 4,76, mas a pH elevado ainda existe muito ácido na forma não dissociada (George et al., 2008). Contudo a acidificação intracelular, em ácidos com cadeia alifática curta (tal como o ác. acético), pode necessitar de maiores concentrações (20-80 mM) para inibir o crescimento (Theron and Lues, 2011). Este ácido é mais eficaz contra as bactérias do que contra as leveduras e bolores. As bactérias que crescem melhor acima de pH 6 são facilmente

inibidas. A acção inibitória do ácido acético é conseguida através da neutralização do gradiente electroquímico da membrana celular, assim como pela desnaturação das proteínas dentro das células (Ray and Bhunia, 2008).

Uma forma alternativa do ácido acético é o seu sal, o acetato de sódio, que pode ser usado como um conservante que controla o pH; aromatizante; estabilizante; adjuvante e tampão em certos produtos lácteos ou carne. Pode ser adicionado a cereais; salgados; sopas; molhos; compotas; óleos e gorduras e frutas (Smith and Hong-Shum, 2003).

### 1.8.1-2. Ácido láctico

O ácido láctico é um ácido orgânico com uma vasta gama de aplicações industriais. É muito utilizado em alimentos como acidulante; agente aromatizante; agente tampão de pH; e como conservante. Este ácido não está naturalmente presente nos alimentos, mas é produzido durante a fermentação de alimentos (pickles, azeitonas, queijo e algumas carnes) pelas bactérias lácticas (Theron and Lues, 2011). O ácido láctico intensifica o sabor e aroma e, é um inibidor microbiano eficaz. Devido à baixa lipossolubilidade difunde-se lentamente através da membrana celular. Este facto sugere que as perturbações do  $pH_i$  da célula não são o principal modo de inibição (Theron and Lues, 2011). Ele produz um efeito inibitório principalmente neutralizando o gradiente de protões de membrana (Ray and Bhunia, 2008).

Este ácido é menos eficaz que o ácido acético, propiónico, benzóico ou sórbico, mas é mais eficiente do que o ácido cítrico (Ray and Bhunia, 2008). É também importante referir que ácidos como o acético e o propiónico têm valores mais elevados de  $pK_a$  do que o ác.Láctico e, portanto, possuem maior proporção de ácido não dissociado num determinado pH (Theron and Lues, 2011).

O ácido láctico é muito eficaz contra bactérias, mas completamente ineficaz contra bolores e leveduras (Ray and Bhunia, 2008).

### 1.8.1-3. Ácido sórbico / Sorbato de potássio

O ácido sórbico é eficaz contra leveduras e bolores, mas este agente antimicrobiano também inibe uma ampla gama de bactérias, especialmente aeróbias e de catalase positiva (Ryser and Marth, 2007). O ácido sórbico e os seus sais, como o sorbato de potássio, têm várias vantagens como conservantes alimentares. Estes conservantes são considerados inofensivos, e não alteram o gosto ou odor do produto (González-Fandos and Dominguez, 2007). O sal de potássio é comumente usado devido à sua natureza estável e é mais solúvel, sendo

adequado para ser usado em imersão e pulverização nas práticas de descontaminação. A inibição da actividade pelos sorbatos é semelhante à do ácido sórbico, mas normalmente é necessário mais de 25% de sorbato de potássio para ter o mesmo efeito antimicótico. O sorbato de potássio é eficaz a pH 6 mas não a pH 7,5 (Theron and Lues, 2011).

O efeito antimicrobiano do sorbato é produzido através da sua acção inibitória sobre as funções de algumas enzimas. Também interfere com a síntese da parede celular, proteínas, RNA e DNA; com o potencial da membrana e inibe a germinação de esporos (Ray and Bhunia, 2008).

O sorbato pode ser aplicado numa ampla gama de alimentos e bebidas, como os xaropes; os sumos de frutos; os vinhos; as geleias; os doces; as saladas; os pickles (Theron and Lues, 2011); a maionese; os vegetais (Ray and Bhunia, 2008); a manteiga; o queijo; as carnes; os cereais e na panificação a fim de prolongar a vida útil de muitos alimentos (Ryser and Marth, 2007).

## 1.9. Leite

O leite é definido como a secreção das glândulas mamárias dos mamíferos, cuja função principal é a nutrição de crianças e crias. O leite de alguns animais, especialmente vacas, búfalos, caprinos e ovinos, também é usado para consumo humano, quer na forma de leite quer numa gama de produtos lácteos (Walstra et al., 2006).

### 1.9.1- Composição do leite

A composição do leite varia consideravelmente entre as espécies e animais (tabela 5). É influenciada pelos seguintes factores: raça; genética animal; alimentação; condições ambientais; volume de leite; estado de lactação e saúde animal. Todos estes factores influenciam o fabrico e as características do queijo (Marth et al., 2006).

Tabela 5 - Composição típica do leite nas diversas espécies animais [% em peso (volume)<sup>-1</sup>] (adaptado de Adams and Moss, 2008).

	Gordura %	Proteína %	Lactose %	Extracto seco %
Humano	3,8	1,0	7,0	12,4
Vaca	3,7	3,4	4,8	12,7
Ovelha	7,4	5,5	4,8	19,3
Cabra	4,5	2,9	4,1	13,2

O leite possui diversos componentes, nomeadamente a água, a lactose, a gordura e as proteínas (tabela 6) (Adams and Moss, 2008). A lactose ou açúcar do leite é o glúcido característico do leite. É um dissacarídeo composto por glucose e galactose e, é um açúcar redutor. A gordura é em grande parte composta por triglicerídeos. Os componentes dos ácidos gordos variam muito no comprimento da cadeia (2-20 átomos de carbono) e na saturação (0-4 ligações duplas). Também estão presentes outros lípidos como os fosfolípidos, ácidos gordos livres, monoglicerídeos, diglicerídeos e colesterol. A maioria das proteínas consistem em caseínas ( $\alpha_{s1}$ ;  $\alpha_{s2}$ ;  $\beta$ ;  $\gamma$  e k-caseína). Para além destas também existem as proteínas séricas do leite, principalmente a  $\beta$ - Lactoglobulina, e inúmeras proteínas minoritárias, onde estão incluídas uma ampla variedade de enzimas. As substâncias minerais, como o potássio, sódio, cálcio, magnésio, cloro e fosfato não são equivalentes aos sais, pois estes são apenas parcialmente ionizados. O conteúdo de todas estas substâncias, excepto a água, é chamado conteúdo de extracto seco (Walstra et al., 2006).

Tabela 6 - Composição aproximada do leite (adaptado de Walstra et al., 2006).

Componentes	Teor médio no leite (%w/w)	Intervalo (%w/w)	Teor médio de extracto seco (%w/w)
Água	87,1	85,3-88,7	-
Gordura não sólida	8,9	7,9-10,0	-
Gordura no extracto seco	31	22-38	-
Lactose	4,6	3,8-5,3	36
Gordura	4,0	2,5-5,5	31
Proteína	3,3	2,3-4,4	25
Caseína	2,6	1,7-3,5	20
Substâncias minerais	0,7	0,57-0,83	5,4
Ácidos orgânicos	0,17	0,12-0,21	1,3
Diversos	0,15	-	1,2

### 1.9.2- Elementos estruturais

O leite é uma emulsão de vários componentes em água, onde a camada de superfície, ou a membrana dos glóbulos de gordura, não é uma camada de adsorção de uma única substância, mas de uma solução com muitos componentes. Apenas uma parte dos lípidos do leite é

encontrada fora dos glóbulos de gordura. A temperaturas inferiores a 35°C, parte da gordura dos glóbulos pode solidificar. As partículas de lipoproteína, chamadas microssomas do leite, variam em quantidade e forma.

Outro elemento estrutural do leite são as micelas de caseínas constituídas por água, proteínas e sais. Nas micelas as caseínas estão presentes como complexos de caseínas individuais ligadas por catiões (principalmente cálcio e magnésio). Outro sal das micelas é o fosfato de cálcio encontrando-se também o ião citrato.

O soro do leite consiste numa fracção rica em lactose e em proteínas do soro. As proteínas do soro estão presentes no leite na forma molecular ou como agregados muito pequenos.

Também estão presentes células como é o caso dos leucócitos que estão sempre presentes no leite (Walstra et al., 2006).

**Tabela 7** - Propriedades dos principais elementos estruturais do Leite (adaptado de Walstra et al., 2006).

	Milk			
	Plasma			
	Glóbulos de gordura	Micelas de caseínas	Soro	
Proteínas globulares			Partículas lipoproteínas	
<b>Componente principal</b>	Gordura	Caseína, água, sais	Proteína do soro	lípidos, proteínas
<b>Considerado como</b>	Emulsão	Dispersão fina	Solução coloidal	Dispersão coloidal
<b>Conteúdo (% extracto seco)</b>	4	2,8	0,6	0,01
<b>Diâmetro da partícula</b>	0,1-10µm	20-400nm	3-6nm	10nm
<b>Número por ml</b>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>14</sup>	10 <sup>17</sup>	10 <sup>14</sup>
<b>Área de superfície (cm<sup>2</sup>/ml de leite)</b>	700	4000	5000	100
<b>Densidade (20°C; Kg m<sup>-3</sup>)</b>	920	1100	1300	1100
<b>Visível com</b>	Microscópio	Ultramicroscópio		Microscópio electrónico
<b>Separado com</b>	Separador de leite	Centrífuga de alta velocidade	Ultrafiltração	Ultrafiltração
<b>pH isoeléctico</b>	-3,8	-4,6	4-5	-4

### 1.9.3- Microflora de leite cru

A abundância de glúcidos, proteínas e gordura, combinado com o pH neutro leva a uma ampla diversidade na ecologia microbiana presente no leite cru. É possível encontrar inúmeros organismos diferentes no leite cru, incluindo:

- os psicotróficos, que podem suportar 7°C ou menos, independentemente da sua temperatura óptima de crescimento;
- os coliformes e outras bactérias *gram* negativas, que podem estar associados à contaminação durante a produção e transformação do leite;
- as bactérias termodúricas, que podem sobreviver a condições de pasteurização;
- os formadores de esporos, que produzem estruturas (esporos) resistentes à pasteurização;
- os patogéneos que causam mamites, que podem ser adicionados ao leite pelas glândulas mamárias infectadas;
- e vários bolores e leveduras (Marth and Steele, 2001).

### 1.9.4- Aspectos relevantes da composição do leite no fabrico do queijo

- 1- Em grande parte a caseína e a gordura determinam as características do queijo. Muitas vezes é considerado o teor de proteína bruta, contudo a proporção de caseína N para o N total (equação 1) é, no entanto, bastante variável e, as proteínas do soro e os compostos de azoto não proteico (NPN) são pouco ou nada retidos no queijo.

$$\text{n}^\circ \text{ de caseína} = (\text{Ncaseína}/\text{N total}) \times 100\% \quad (\text{Equação 1})$$

- 2- A proporção entre gordura e caseína determinam principalmente o teor de extracto seco no queijo. E também afecta um pouco a sinérese, influenciando o teor de água final no queijo.
- 3- O teor de lactose, livre de gordura e caseína, determina a produção de ácido láctico e afecta significativamente o pH, o teor de água e as propriedades decorrentes do queijo.
- 4- O pH do queijo também depende da capacidade de tamponamento do extracto seco. A única variável importante é a proporção entre o fosfato de cálcio coloidal e a

caseína. Esta proporção não varia muito, geralmente aumenta um pouco na fase de lactação.

- 5- O efeito da renina sobre o leite e a capacidade deste sofrer sinérese pode variar bastante, principalmente por causa das variações na actividade do cálcio, mas também devido ao efeito de outros componentes.
- 6- O crescimento bacteriano pode diminuir a produção de ácido láctico. A maioria dos factores naturais (como o sistema lactoperoxidase) não varia muito no leite. No entanto a presença de antibióticos pode prejudicar a produção de ácido e a maturação do queijo (Walstra et al., 2006).

## 1.10. Queijo

O fabrico de queijo começou à cerca de 8000 anos e agora existem no mundo mais de 2000 variedades de queijo, cada um único e com o respectivo sabor e forma (Beresford et al., 2001; Belitz et al., 2009). O fabrico de queijo envolve a combinação de quatro ingredientes comuns: leite, coalho, microrganismos e sal; que são processados através de uma série de etapas comuns, tais como a formação de um gel, expulsão de soro, produção de ácido e adição de sal, seguido por um período de maturação (Beresford et al., 2001).

As variedades de queijo podem ser classificadas com base em diversos critérios, como por exemplo:

- O tipo de leite (vaca, cabra ou ovelha);
- A formação da coalhada (usando ácido, extractos de coalho ou ambos);
- Textura ou consistência. Seguindo este critério os grupos de queijos mais importantes são, em termos de % de água:
  - a. Extra duro: <51%;
  - b. Duro: 49-56%;
  - c. Semi-duro: 54-63%;
  - d. Semi-mole: 61-69%;
  - e. Mole:>67%.
- Teor de gordura (% de extracto seco). Por este critério, os grupos mais importantes são:
  - a. Duplo queijo creme (gordura 60-85%);
  - b. Queijo (>50%);
  - c. Queijo gordo completo (>45%);
  - d. Queijo gordo (>40%);
  - e. Queijo semi-gordo (>20%);

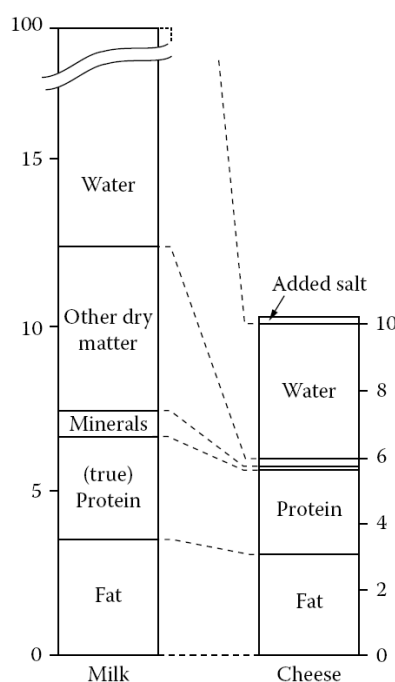
f. Queijo desnatado (máximo 10%).

Dentro de cada grupo, os queijos são caracterizados pelo aroma (Belitz et al., 2009).

Para além do que já foi mencionado anteriormente os queijos têm algumas coisas em comum, nomeadamente:

- A maior parte das caseínas e da gordura do leite estão concentradas no queijo, sendo um produto muito nutritivo;
- O queijo mantém-se por muito mais tempo do que o leite ou do que outros produtos lácteos fermentados;
- O queijo geralmente tem características e sabores distintos devido a um grande número de compostos formados durante a maturação (Walstra et al., 2006).

Quando o leite é transformado em queijo, as caseínas e a gordura são concentradas na coalhada, enquanto que os outros componentes do leite, especialmente a água, são removidos juntamente com o soro. Nenhum dos componentes do leite é totalmente mantido, como podemos ver pela figura 2, e podem ser adicionadas novas substâncias, nomeadamente o sal.



**Figura2-** Exemplo da composição do leite e do queijo e da transferência dos componentes do leite para queijo (Escala em kg) (adaptado de Walstra et al., 2006).

A produtividade e a composição dos queijos são determinadas pelas propriedades do leite, especialmente pela composição e pelo processo de fabrico. Contudo o modo de processamento pode afectar fortemente os custos de produção; nomeadamente os aditivos necessários, a mão de obra, o equipamento e a perda de produto (Walstra et al., 2006).

A produção de queijo é um processo complexo que envolve duas fases interligadas: a primeira é desenvolver a composição desejada e o pH (controlada pela composição do leite e pelo processo de fabrico), e a segunda é o desenvolvimento das características físicas e do sabor (influenciada pela primeira mas também pelo metabolismo de uma variedade de microrganismos e de reacções enzimáticas e químicas) (Marth and Steele, 2001).

### 1.10.1- Etapas do processo de fabrico do queijo

O fabrico de queijos envolve vários processos diferentes, alguns dos quais são essenciais para (quase) todas as variedades de queijo:

- 1) Coagulação do leite;
- 2) Remoção do soro do leite;
- 3) Produção de ácido;
- 4) Salga;
- 5) Fusão dos pedaços de coalhada numa massa fácil de manusear;
- 6) Cura (Marth and Steele, 2001)

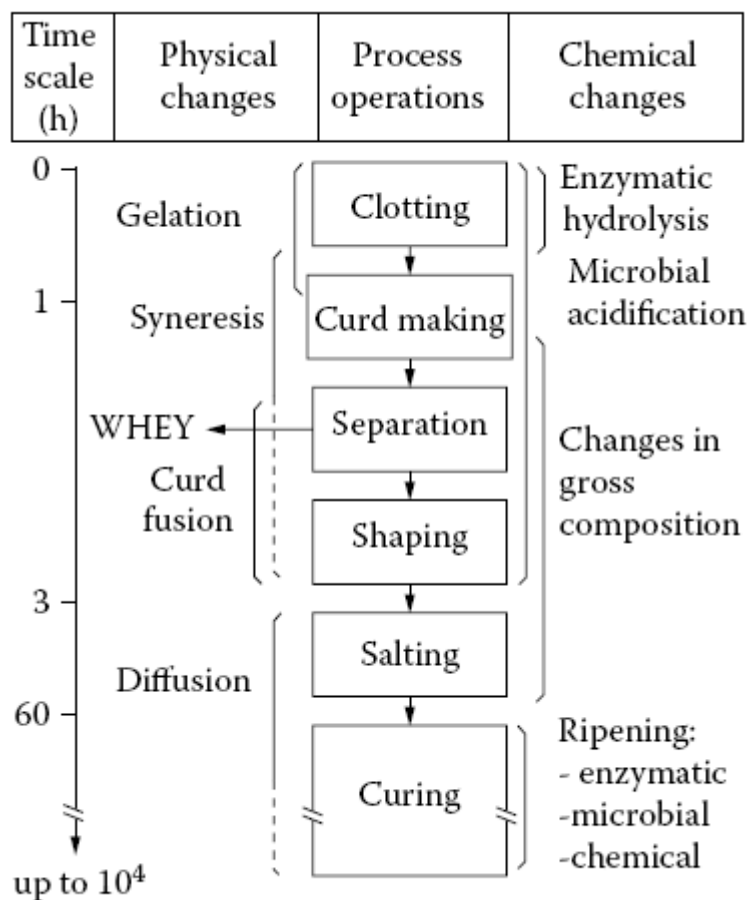


Figura 3 - Esquema das mudanças (bio)químicas e físicas que ocorrem durante a transformação do leite em queijo (adaptado de Walstra et al., 2006).

Durante o fabrico do queijo, forma-se um coágulo (num processo que demora cerca de 40 minutos a 30-32°C) na qual as proteínas do leite (caseínas) são retidas, conjuntamente com a gordura do leite (Marth and Steele, 2001; comunicação pessoal)

O gel formado é propenso a sinérese espontânea, isto é, expulsão do soro. A expulsão do soro é geralmente reforçada pelo corte do gel em pequenos pedaços e pela agitação da mistura da coalhada com o soro. A coalhada obtida equivale a 10-30% do volume inicial do leite. Quanto maior for a expulsão do soro, mais firme e durável será o queijo. Durante este processo há a produção de ácido devido à conversão da lactose a ácido láctico através das bactérias lácticas. Posteriormente à adição de cloreto de sódio (NaCl) o que influencia o sabor, a consistência e o amadurecimento do queijo, para além disso tem um importante papel na preservação do queijo, pois a elevado teor de sal o crescimento das bactérias ácido lácticas é inibido. A maioria das variedades dos queijos é submetido à adição de 2% de sal, ou à imersão em água contendo cerca de 15% de sal (salmoura). A salga afecta o rendimento na produção

do queijo, pois o sal é absorvido no queijo, ao mesmo tempo que há saída de água, resultando numa perda substancial de peso. Esta perda de peso ascende os 3% durante a salga. A maioria dos queijos são moldados e muitas vezes prensados antes da cura. Assim depois da maioria da lactose ser transformada em ácido é que ocorre a salga na salmoura. Isto tem três finalidades, que são as seguintes: o arrefecimento do queijo; o impedimento que a massa ainda mole perca consistência por acção da gravidade; e a absorção de sal (Walstra et al., 2006; comunicação oral).

Por fim os queijos são sujeitos a condições de armazenamento controlado e específico para cada tipo de queijo (nomeadamente 8-14°C, humidade relativa de 80-90% durante no mínimo de 40 dias) (Walstra et al., 2006; comunicação pessoal).

Durante a maturação, ocorre a perda de humidade, uma combinação complexa de reacções microbianas e enzimáticas, envolvendo as enzimas do leite, o coagulante, as proteases e peptidases da cultura “iniciadora” e os organismos “não-iniciadores”, que permanecem viáveis, embora o crescimento seja inibido (Fernandes, 2009). Assim o amadurecimento do queijo é o principal factor que determina o sabor típico e a textura dos diferentes tipos de queijo (Walstra et al., 2006).

### 1.10.2- Microbiologia do queijo

A diversidade dos protocolos de fabrico do queijo, os regimes de maturação e a composição do queijo é um assunto complexo do ponto de vista microbiológico. Cada queijo individual tem a sua própria e única microflora independentemente dos “iniciadores” ou de qualquer adição deliberada de microrganismos de amadurecimento secundários (isto é, bolores ou leveduras). Há uma extensa lista de microrganismos que podem crescer no queijo. Estes microrganismos “não iniciadores”, adicionados não deliberadamente são contaminantes para o leite ou queijo. Assim, os contaminantes que são encontrados em qualquer queijo resultam de microrganismos específicos que aparecem no leite ou nos equipamentos, ou no ar ou nos seres humanos que tiveram contacto directo com o queijo ou leite. É muito difícil interpretar os dados sobre o conteúdo microbiano do queijo por causa da possibilidade de contaminação. Além disso, o ambiente envolvente desempenha um papel fundamental no crescimento de microrganismos no queijo.

Os microrganismos que crescem no queijo ou que mantêm a sua viabilidade seguem o mesmo conjunto de critérios (pH, humidade, sal, acidez, potencial redox, disponibilidade de nutrientes, competição, temperatura e condições anaeróbicas/aeróbicas) como em qualquer produto alimentar. Há dois factores que determinam a microflora do queijo: a presença e sobrevivência de microrganismos e a capacidade dos microrganismos crescerem.

Durante a maturação do queijo, as condições ambientais podem alterar-se o suficiente permitindo o crescimento de contaminantes inicialmente inibidos, ou as condições podem tornar-se ainda mais inóspitas. O ambiente do queijo é dinâmico. Assim, a microflora no queijo pode ser considerada como um sistema ecológico e dinâmico (Marth and Steele, 2001)

### 1.10.3- Culturas “iniciadoras”

A acidificação do leite é o passo fundamental para o fabrico do queijo. A acidificação é essencial para o desenvolvimento do sabor e textura; promove a coagulação e a redução do pH que inibe o crescimento de patógenos e a deterioração de organismos (Fernandes, 2009).

A coagulação é obtida pela actividade de um coagulante, ou de uma mistura de enzimas com actividade proteolítica específica. Os coalhos podem ser de diferentes fontes, como fungos, animais ou plantas. Todos contêm enzimas proteolíticas, que através da sua actividade contribuem para desestabilizar as micelas de caseínas no leite (Marth and Steele, 2001).

Tradicionalmente no fabrico de queijo Português é usado principalmente um extracto de flores de cardo de *Cynara cardunculus* (Tejada et al., 2008). Estas contêm proteínases como a cardosina A e cardosina B; sendo a primeira semelhante à quimosina e a segunda é uma enzima do tipo da pepsina (Pereira et al., 2008). As proteínas ao sofrerem proteólise, têm grande impacto no desenvolvimento das características organolépticas, abrangendo o sabor e a textura (Tavaria et al., 2003).

### 1.11. Métodos

A contagem de colónias é um método tradicional, mas para estimar curvas de crescimento microbiano este método é demorado, intensivo e pouco preciso. A quantidade de dados necessários para gerar modelos de confiança levou os investigadores a usar métodos como o da turbidimetria ao invés do método de contagem (Wu et al., 2000).

É um princípio bem conhecido que os microrganismos ao crescerem aumentam a turbidez no seu meio de crescimento. Ao medir-se a turbidez ao longo do tempo, pode reproduzir-se uma curva de densidade óptica (OD). A curva reflecte o crescimento (aumento da concentração) do organismo de interesse. É possível medir a turbidez através do aparelho Bioscreen.

O Bioscreen é um sistema concebido para automatizar o trabalho de rotina em microbiologia. Ele usa um formato de micro-placas (10x10 poços), que é especialmente adequado para o controlo de temperatura. Possui duas placas em favo de mel cobertas, tornando possível executar 200 amostras em simultâneo. Este equipamento é controlado por um computador e possui um incubador; agitador e leitor, equipado com 8 filtros de 405nm a 600nm. O

Bioscreen é usado para monitorizar o crescimento de culturas puras e mistas de bactérias; leveduras; fungos; células ou fagos; e para verificar o efeito de parâmetros simples ou múltiplos, tais como a temperatura e os diferentes produtos químicos. A informação das medições de turbidez é processada para gerar curvas de crescimento microbiológico e estes são exportados para um computador (para MS Excel).

## Capítulo II - Materiais e Métodos

### 2.1- Materiais e reagentes

Durante o trabalho experimental foram utilizados os seguintes reagentes (tabela 8). Foram também usados os equipamentos e os meios de cultura mencionados na tabela 9 e tabela 10, respectivamente.

Tabela 8- Lista de reagentes.

Reagentes	Pureza %	Fornecedor
Ácido acético	99,7	Sigma- Aldrich
Ácido láctico	80	Galactic
Sorbato de potássio	98	REIPU
Acetato de sódio	99,9	Sigma- Aldrich
Ácido clorídrico	Composição da ampola: 0,365% de ácido clorídrico e 99,635% de água	Sigma- Aldrich
Hidróxido de sódio	Composição da ampola: 8% hidróxido de sódio e 92% de água	Sigma- Aldrich
Meio OCLA	-	OXOID
Meio RBC	-	MERCK
Meio MRD	-	MERCK
Meio TSB	-	MERCK
Água peptonada	-	MERCK
YE	-	MERCK
VASCOPLAST	500ppm natamicina (E235) + 2% sorbato de potássio (E202)	DSM
Delvocoat	3000ppm natamicina(E235) + 2% sorbato de cálcio (E203)	DSM

Tabela 9- Lista dos equipamentos.

Aparelho	Marca	Modelo
Autoclave	Tuttnauer	3850M
Balança analítica	AND	FR-200
Estufa 37°C	Binder	3.1
Estufa 27°C	Selecta P	digitronic
Bioscreen	Thermo Labsystems	C

Tabela 10- Lista dos meios de cultura.

Meio / Composição (g/litro)	TSB	MRD	RBC	Água peptonada	OCLA*
Peptona de caseína	17,0	-	-	10,0	-
Peptona de farinha de soja	3,0	-	-	-	-
Peptona	-	1,0	-	-	-
Glucose	2,5	-	10,0	-	2,0
NaCl	5,0	8,5	-	5,0	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5	-	1,0	1,5	-
Mycological peptone	-	-	5,0	-	-
MgSO <sub>4</sub>	-	-	0,5	-	-
Rose bengale	-	-	0,05	-	-
Chloramphénicol	-	-	0,1	-	-
Agar-agar	-	-	15,5	-	12,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	-	-	-	9,0	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	-	-	2,5
x-glucoside	-	-	-	-	0,05
LiCl	-	-	-	-	10,0
Digestivos enzimáticos de tecidos animais	-	-	-	-	18,0
Digestivos enzimáticos de caseína	-	-	-	-	6,0

\*- A este meio foram adicionados dois suplementos: Brilliance *Listeria* Diferencial Suplemente (SR0228E) e OCLA(ISSO) Selective Suplemente (SR0226E).

## 2.2- Parte experimental

### 2.2-1. Cultura

No trabalho experimental foram utilizados dois microrganismos, a *Listeria innocua* (ATCC 33090, OXOID) e a *Listeria monocytogenes*, esta foi isolada a partir de queijos feitos com leite cru naturalmente contaminados.

## 2.2-2. Queijos

Para testar o efeito dos conservantes foram utilizados queijos produzidos na Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Baixa - Idanha-a-Nova, CRL. Utilizaram-se dois tipos de queijos, uns foram produzidos com leite cru de ovelha e os outros tinham mistura de leite de ovelha e cabra, em volume de 60% e 40 %, respectivamente.

## 2.2-3. Design Experimental

O design experimental das experiências foi realizado de acordo com o “Central Composite Design” (CCD). Foi obtido um total de nove combinações, incluindo o  $2^2$  de design factorial de nível dois; o ponto central e o ponto estrela. O número 2 corresponde às variáveis independente utilizadas, que consistem no pH e na concentração de conservante. As nove combinações foram obtidas por diferentes combinações entre as variáveis independentes:

- Ponto central \* (0,0);
- Ponto estrela ( $\pm\alpha,0$ );
- Pontos factoriais ( $\pm 1,\pm 1$ )

(onde o valor de  $\alpha = 1,414$ )

Tabela11: Combinações de pH e concentração de conservante segundo o CCD.

<i>Conservante</i>	<i>pH</i>	<i>Conservante (em %)</i>	<i>pH</i>
-1	-1	2	5
1	-1	4	5
-1	1	2	7
1	1	4	7
0	0	3	6
- $\alpha$	0	1	6
+ $\alpha$	0	5	6
0	- $\alpha$	3	4
0	+ $\alpha$	3	8

\*O ponto central foi determinado em triplicado

#### 2.2-4. Efeito dos conservantes na *Listeria spp.*

A fim de obter culturas frescas, adicionou-se 100µl de *Listeria innocua/Listeria monocytogenes* a 4 ml de meio TSBYE e incubou-se a 37°C durante 24 horas. Passado um dia, adicionou-se 100µl dessa cultura a diversos tubos com 4ml de TSB com 0,6% de extracto de levedura (TSBYE) com diferentes pHs (4,5,6,7,8). O pH destes tubos foi acertado através do uso de HCl (1M) e NaOH (2% p/v).

Após a preparação de todas as soluções, isto é: *Listeria* + TSBYE; ácido acético, ácido láctico, acetato de sódio (25%) e sorbato de potássio (25%); executaram-se diferentes combinações de concentrações de conservantes e de pHs de acordo com o ponto 2.2-3. Posteriormente procedeu-se ao preenchimento de cada poço de uma placa de 100 poços, com um volume total de 250µl por poço.

De seguida, introduziu-se a placa no aparelho Bioscreen. Este permitiu a leitura de 10 em 10 minutos por um período de 24 horas da densidade óptica de cada poço, numa banda de comprimentos de onda entre os 420-560nm.

Posteriormente repetiu-se a experiência ajustando o pH ao pH comum do queijo (4-6) e diminuiu-se a concentração de conservante (0,5 % - 3 %). Neste ensaio testou-se apenas o efeito do ácido láctico e do ácido acético na *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes*.

#### 2.2-5. Efeito da turbidez

A partir de uma placa OCLA com *Listeria innocua*, retirou-se uma colónia de *Listeria innocua* com o auxílio de uma zaragatoa para um tubo de 5 ml de MRD, até atingir uma turbidez de 1McF (método por comparação com um Kit, Mc Farland Standard, Biomérieux). Desse tubo retirou-se 100µl para tubos de ensaio com 10ml de TSBYE. A três desses tubos adicionaram-se os conservantes, com diferentes concentrações (1%, 2%, 5%) de ácido acético, acetato de sódio, ácido láctico e sorbato de potássio. Com estes tubos foram feitas cinco diluições e inocularam-se 100µl de cada tubo para placas OCLA. Os tubos e as placas foram incubados 24h a 37°C. Passado um dia, procedeu-se ao registo de pH, da turbidez e à contagem de *Listeria*.

Foi feito o mesmo estudo para o caso dos bolores e da flora microbiana, com o meio de cultura RBC, incubado a 27°C durante 7 dias.

## 2.2-6. Contaminação e análises aos queijos

### 2.2-6.1. Solução de contaminação

A solução de contaminação foi preparada da seguinte forma: a 96% de água adicionou-se 2,5% de TSBYE com *Listeria innocua* e 1,5% de MRD contendo bolores. Desta mistura retirou-se 4mL de amostra para posterior contagem de bolores e *Listeria innocua*. Esta solução apresentava uma concentração de bactéria entre  $10^6$ - $10^8$ /ml.

### 2.2-6.2. Análise da solução de contaminação

A partir da amostra da solução de contaminação retirou-se 100µl para um tubo de ensaio com 10ml de TSBYE e procedeu-se a seis diluições. Desses tubos inocularam-se 100µl para placas OCLA (37°C/24h) e placas RBC (27°C/3-5dias). Passado o tempo de incubação, registou-se o pH e o número de colónias de *Listeria* e bolores.

### 2.2-6.3. Contaminação (dia 0)

Os queijos foram imersos um a um na solução de contaminação por breves segundos (2-5s) e colocados na câmara de maturação com a temperatura entre 8-11°C e com humidade relativa entre 89-95% ou na estufa a 27°C, dependendo do teste que se estava a realizar.

### 2.2-6.4. Análise à casca do queijo (dias 1; 5/7; 12/13)

Passou-se uma esponja estéril (Polywipe TM, Medical Wire & Equipment) pela superfície do queijo (1face) e colocou-se essa esponja num saco estéril que continha 25ml de água peptonada, por um período de tempo de 30 minutos à temperatura ambiente. Retirou-se 100µl da solução desse saco e procedeu-se como em 2.2-6.2. Passado os dias de incubação procedeu-se à contagem de colónias por cm<sup>2</sup>.

### 2.2-6.5. Solução com o conservante (dia 1)

Prepararam-se as seguintes soluções: 95% de água destilada/ 5% de ácido acético e 60% de água destilada/ 40% de Delvocoat. Todos os queijos foram mergulhados durante breves segundos (2-5s) na solução de conservante. Posteriormente os queijos eram armazenados na câmara/estufa.

### 2.2-7. Análise sensorial/ Prova de queijos

Dois queijos, um sem adição de qualquer conservante e outro apenas com adição de 5% de ácido acético, foram lavados com água corrente e secos. Foram partidos e colocados à disposição de um painel de provadores constituído por três técnicos da Cooperativa, através de amostras cegas. Após a prova dos queijos foram recolhidas as considerações sobre a presença de sabores e odores estranhos ao queijo.

## Capítulo III- Resultados / Discussão

### 3.1- *Listeria innocua* vs *Listeria monocytogenes*

Como podemos observar pela figura 4 o comportamento do crescimento das espécies, *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes*, ao longo do tempo é semelhante.

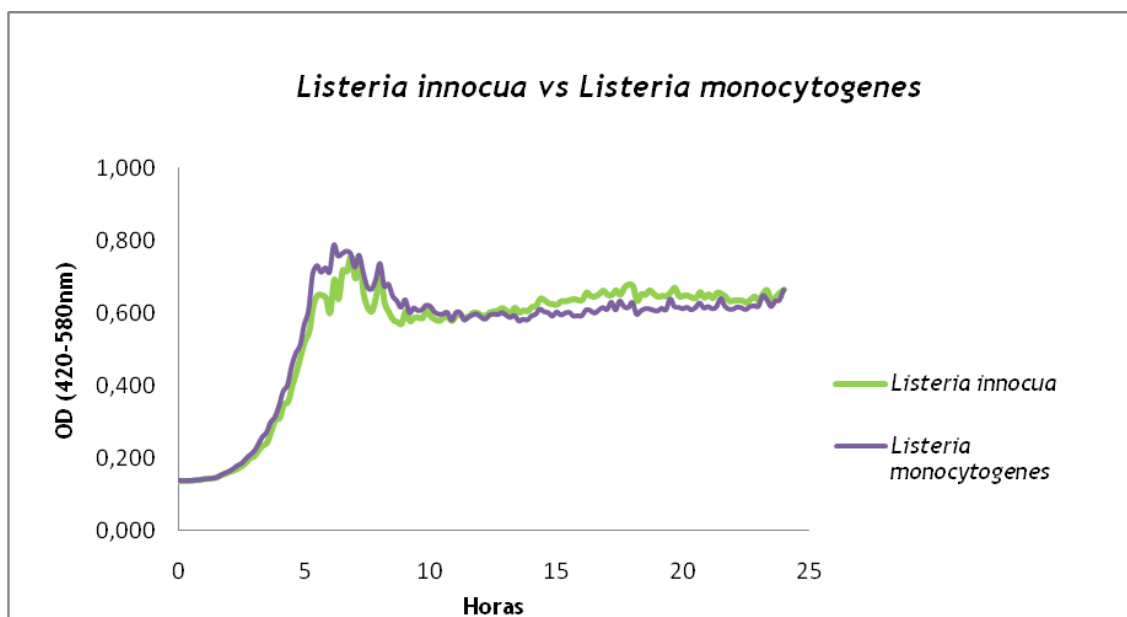


Figura 4- Curvas de crescimento da *Listeria innocua* e da *Listeria monocytogenes*.

Pela observação do gráfico, a fase *lag* é relativamente curta, o que está de acordo com o que afirmou Ryser and Marth (2007), que a *Listeria monocytogenes* quando era cultivada a 37°C a fase *lag* era de 1,7 horas. Quanto à fase exponencial também está de acordo com o que está descrito na literatura, como comprovou Whiting and Bagi (2001), a fase exponencial dura cerca de 3 horas.

Devido às semelhanças no crescimento de ambas as espécies e para evitar a contaminação de *Listeria monocytogenes* no interior da empresa, foi decidido usar *Listeria innocua* como microrganismo indicador por este não ser considerado patogénico.

### 3.2- Efeito do pH no crescimento da *Listeria spp.*

No controlo deste ensaio foi usada a *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes* a diferentes pHs, e como podemos ver pela figura 5,6 e 7, a *Listeria* a pHs mais baixos cresce menos do que a pHs básicos.

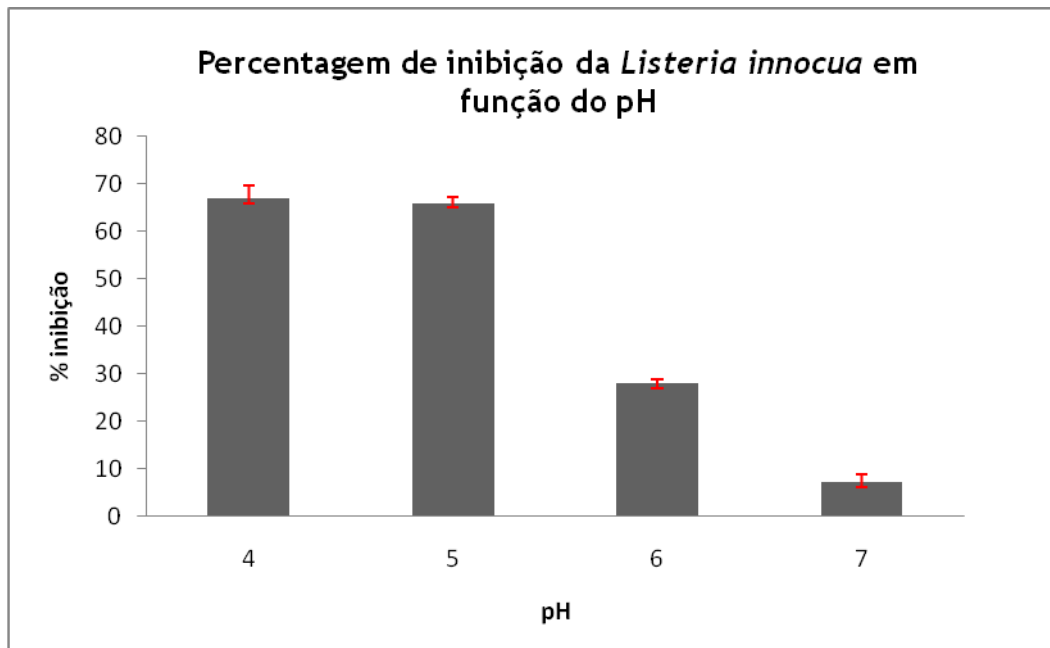


Figura 5 - Efeito do pH (4-7) no crescimento da *Listeria innocua* (n=2)

Para estudar o efeito do pH no crescimento de *Listeria innocua*, foi usado o meio TSBYE a diferentes pHs. A estirpe de *Listeria* utilizada, segundo Marc et al. (2002) apresenta um pH mínimo de crescimento entre 4,05 e 4,36. Obteve-se uma percentagem de inibição de aproximadamente 67 % a pH 4 e a pH 5.

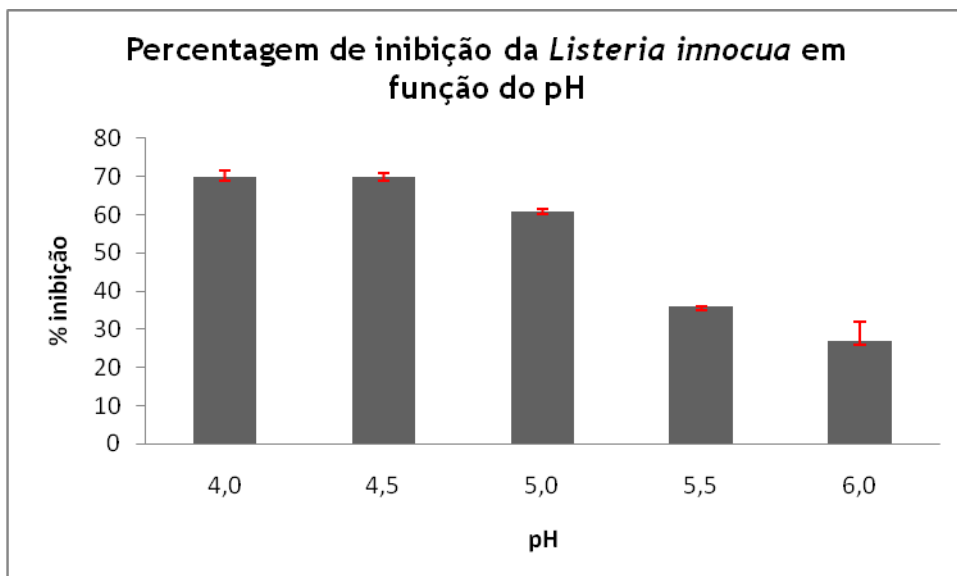


Figura 6 - Efeito do pH (4-6) no crescimento da *Listeria innocua* (n=2)

O mesmo se verificou em intervalos de pH mais curtos (figura 6, 7), onde em meio ácido a percentagem de inibição de *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes* é considerável, apresentando valores de 70% e 74% de inibição, respectivamente. Contudo a pH baixos ambas as espécies de *Listeria* apresentam valores muito semelhantes, porém à medida que aumenta o pH esse comportamento começa a ser discrepante.

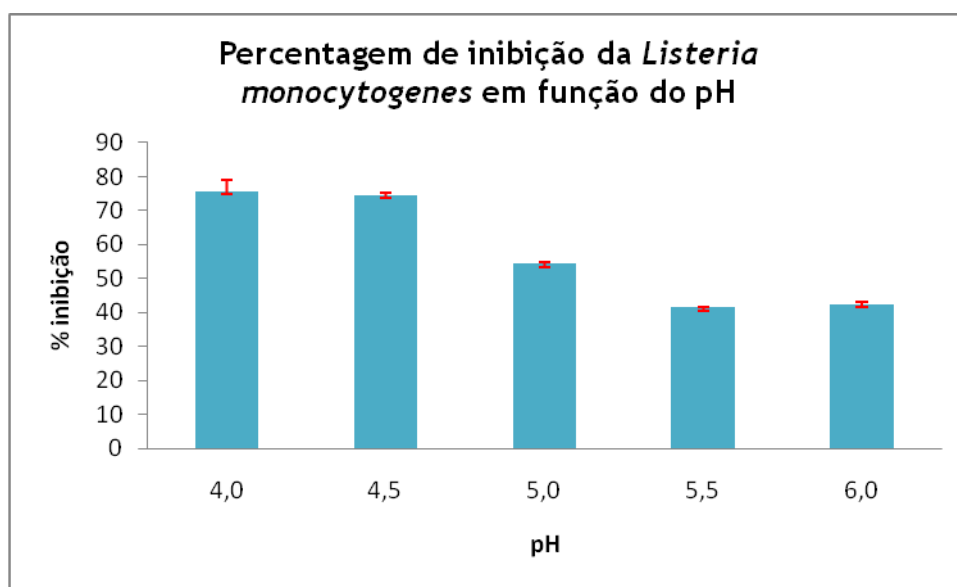


Figura 7 - Efeito do pH (4-6) no crescimento da *Listeria monocytogenes* (n=2)

Assim verifica-se que o pH possui efeito inibitório sobre o crescimento da *Listeria*. Contudo é importante referir que na maturação do queijo, o pH deste não chega atingir valores de pH inferiores a 4,5 inclusive. Daí o factor pH por si só não consegue eliminar a *Listeria* no queijo apesar de contribuir para a inibição do seu crescimento.

### 3.3- Análise dos conservantes no Bioscreen

Após a análise de dados e curvas de crescimento obtidos através do Bioscreen, os resultados foram tratados numa folha de cálculo do Excel, permitindo a obtenção de gráficos de superfície dos diferentes conservantes, nomeadamente do sorbato de potássio, do acetato de sódio, do ácido acético e do ácido láctico.

- Sorbato de Potássio

A figura 8 representa os resultados para o sorbato de potássio, verificando-se percentagens de inibição de 100% a pH 4 e pH 8, a 1% (v/v) e 5% (v/v) de sorbato de potássio, respectivamente.

Tais resultados parecem ser apenas explicados pelo pH, visto que a pH 8 a percentagem de conservante é maior, o que diminui o pH e impede o crescimento de *Listeria innocua*. No entanto a percentagem de inibição com o conservante é consideravelmente maior, cerca de mais 30% a pH 4, relativamente ao efeito de pH por si só.

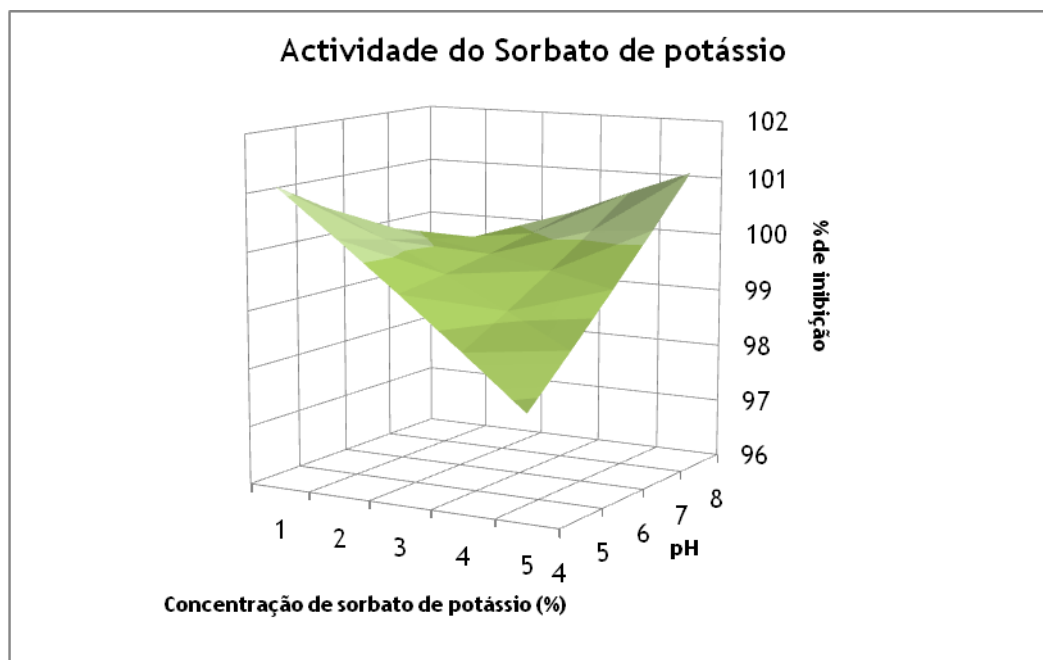


Figura 8 - Efeito do sorbato de potássio no crescimento de *listeria innocua*.

É conhecido o efeito do sorbato de potássio na eliminação de *Listeria monocytogenes* noutros alimentos, como observou Samelis et al. (2001) quando conseguiu eliminar a *Listeria monocytogenes* com 5% de sorbato de potássio em fatias de mortadela; González-Fandos (2007) em pernas de aves, com reduções de 0,6 a 1,3 log de *Listeria monocytogenes*; e Theron and Lues (2011) em carnes processadas refrigeradas.

- Acetato de Sódio

Os resultados do acetato de sódio estão representados na figura 9. Verifica-se que há eliminação total da *Listeria innocua* quando a concentração de acetato de sódio é 3 % (v/v) em toda a gama de pH. Contudo chega a ter percentagens negativas a concentrações de 5% (v/v) a pH baixos. O acetato de sódio parece ser o menos eficaz na inibição do crescimento de *Listeria innocua*. Contudo existem dados controversos na literatura relativamente à *Listeria monocytogenes*, nomeadamente Neetoo et al. (2008) provou que acetato de sódio 0,25% (p/v) é capaz de inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* durante três semanas de armazenamento em patê de salmão. Já Sallam (2007) verificou a capacidade dos sais de sódio de ácidos orgânicos, como o acetato de sódio 2,5% (p/v), para eliminar microrganismos

de deterioração em fatias de salmão quando são sujeitas à imersão em soluções aquosas destes sais. Ryser and Marth (2007) verificaram que o acetato de sódio na superfície de salsichas inibiu o crescimento de *Listeria* acima dos 14 dias de armazenamento a 4-13°C. Durante o mesmo período de tempo e à mesma temperatura, Theron and Lues (2011) observaram que o acetato de sódio (2%) proporciona uma redução significativa no crescimento de bactérias psicotróficas em filetes de peixe-gato. Apesar de todos os estudos até agora terem sido realizados a temperaturas comuns às aplicadas no fabrico de queijo, o período de tempo que este conservante actua sobre a *Listeria* não é adequado para o queijo, pois no mínimo o queijo permanece na fábrica entre 30 a 40 dias.

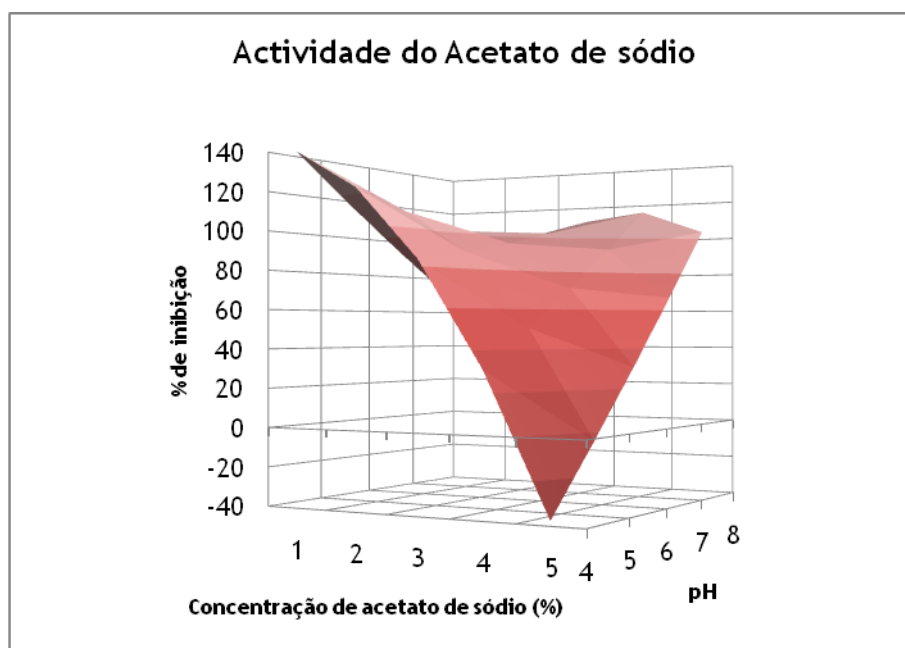


Figura 9 - Efeito do acetato de sódio no crescimento da *Listeria innocua*.

- **Ácido Láctico**

Os melhores resultados foram obtidos com os ácidos. Como podemos ver na figura 10, a percentagem de inibição do ácido láctico ronda os 99-100% de inibição da *Listeria innocua*. Contudo as melhores condições de inibição são verificadas entre 2-3% (v/v) de ácido láctico entre 5-6 de pH. No entanto estamos a falar de variações entre 99,80% e 100%.

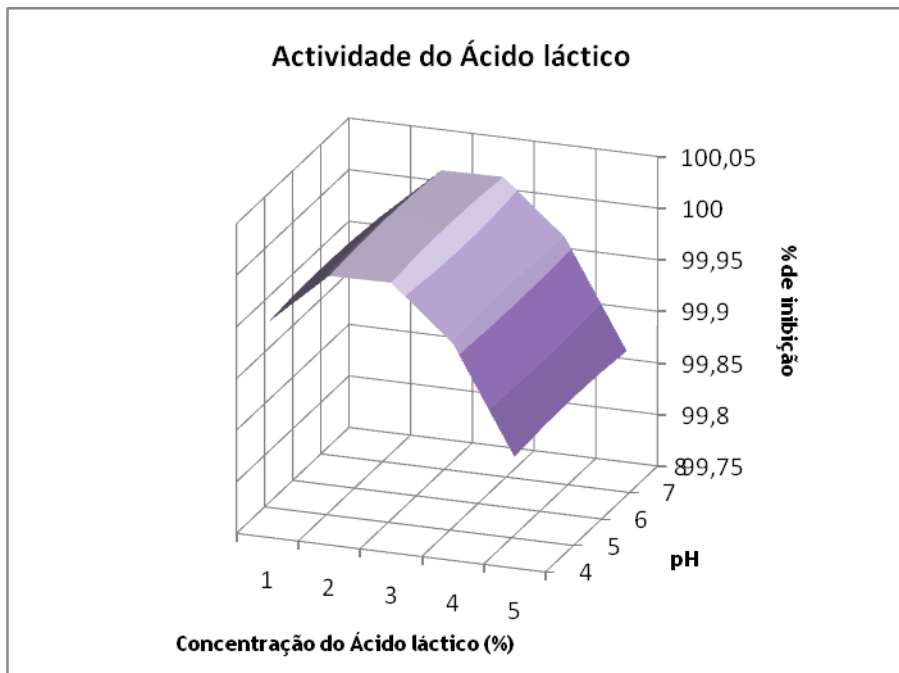


Figura 10 - Efeito do ácido láctico no crescimento da *Listeria innocua*.

- **Ácido Acético**

O ácido acético também representa bons resultados, no entanto as percentagens de inibição da *Listeria innocua* são ligeiramente mais baixas. Na figura 11, é a 1% (v/v) de ácido acético e entre 6-7 de pH que se verifica a maior percentagem de inibição. Porém também é de referir que a pH 4, seja qual for a concentração de ácido acético, a percentagem de inibição mantém-se elevada, mas decresce à medida que o pH aumenta.

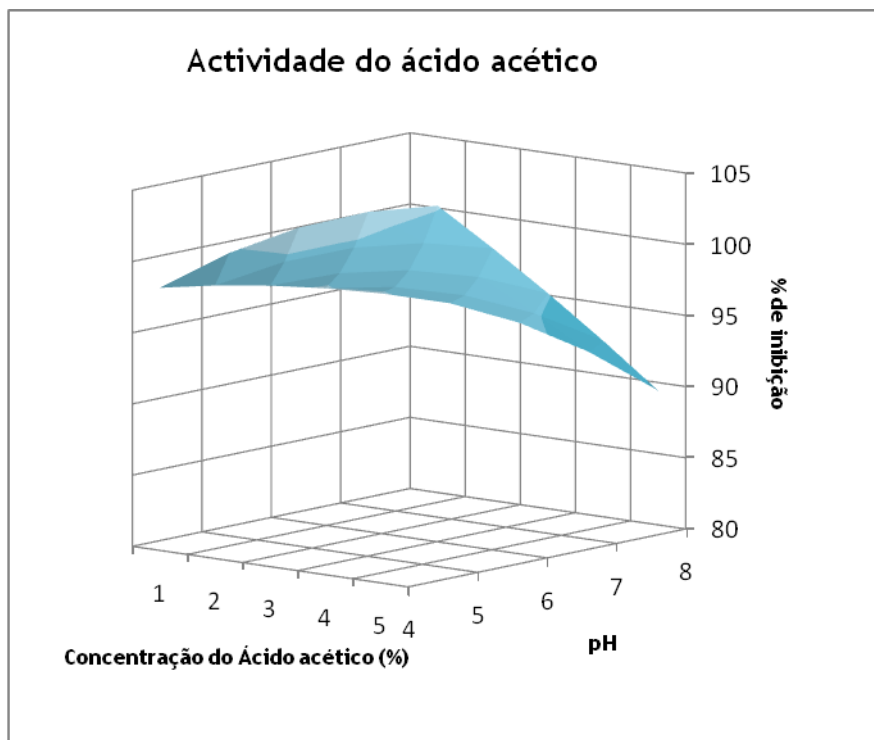


Figura 11 - Efeito do ácido acético no crescimento da *Listeria innocua*.

Segundo Ryser and Marth (2007), a taxa de crescimento da *Listeria monocytogenes* na presença de ácidos orgânicos varia significativamente com o tipo e concentração de ácido e do pH do meio. Como o ácido acético apresenta um valor de pKa mais elevado, logo maior será a proporção de ácido não dissociado num determinado pH. Contudo as variações na percentagem de inibição não são significativas.

### 3.4- Efeito bactericida

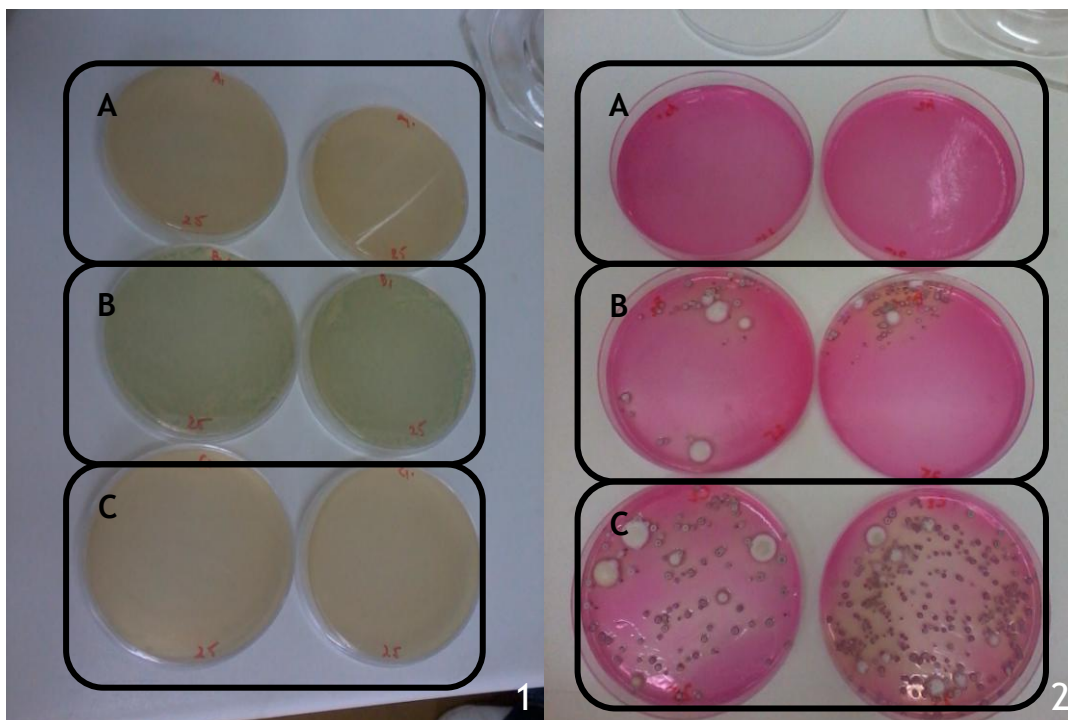
Para determinar se os ácidos apresentavam efeito bactericida, foram repetidos os ensaios em placa com meio OCLA (Oxoid Chromogenic Listeria Agar) a 37°C. Confirmou-se que o ácido acético tem propriedades bactericidas contra a *Listeria innocua* a partir de 1% (v/v) com uma redução de 5,0log UFC/ml<sup>2</sup> enquanto que o ácido láctico inibe a partir de 2% (v/v) com uma redução de 3,5log UFC/ml<sup>2</sup>. Quanto ao acetato de sódio e o sorbato de potássio os resultados não foram os esperados. O acetato de sódio não eliminou a *Listeria innocua* a nenhuma concentração, e o sorbato de potássio apenas reduziu 0,7log UFC/mL<sup>2</sup> numa concentração de 5% (v/v).

Tais resultados coincidem com as conclusões de Ryser and Marth (2007), segundo as quais os efeitos anti-*Listeria* foram mais pronunciados nos alimentos acidificados com o ácido acético do que com o ácido láctico. Isso deve-se ao facto de os ácidos orgânicos serem mais bactericidas no estado não dissociado que dissociado. O aumento da inactivação da *Listeria* na presença de ácido acético é provavelmente o resultado da maior proporção de ácido acético não dissociado (~36%) ao invés do ácido láctico (~5,9%) em alimentos acidificados como o queijo a pH 5,0-5,1. Contudo o ácido láctico é eficaz contra a *Listeria monocytogenes* a concentrações de 1,5% em frutas; a 1-3% em salsichas, como observou Byelashov et al. (2010); e a 2,5/5% em fatias de mortadela, como foi verificado no estudo de Samelis et al. (2008).

A acção do sorbato de potássio é justificado por Ray and Bhunia (2008), que verificam que este conservante é mais eficaz contra os bolores e leveduras do que contra bactérias. Porém as variações nos meios ou alimentos, no pH ou nas concentrações de sorbato alteram a eficácia do sorbato de potássio, Theron and Lues (2011).

Relativamente ao acetato de sódio como já foi mencionado existem dados que comprovam que este conservante elimina a *Listeria*, contudo isso não se verificou neste trabalho.

Um dos problemas que surge esporadicamente nos queijos é o aparecimento de bolores em queijos. Por esta razão testamos o efeito do ácido acético, pois foi o que apresentou melhores resultados na *Listeria innocua*, e o efeito do conservante usado diariamente no fabrico do queijo, o Delvocoat, na eliminação da *Listeria innocua* e em bolores. A 2% e 5% (v/v) de ácido acético a redução de bolores foi de 4,3 log UFC/ml, mas a 1% (v/v) só reduziu 1,6log UFC/ml. Para verificarmos o efeito bactericida comparou-se o efeito do Delvocoat, do ácido acético (5% v/v) e da junção dos dois (figura 12).



**Figura 12** - Efeito do bactericida e fungicida do ácido acético/Delvocoat (A); Delvocoat (B); ácido acético (C) contra a *Listeria innocua* (1) e os bolores (2).

Como observamos pela figura 12, relativamente a 1 verificamos que o Delvocoat não apresenta efeito bactericida na *Listeria innocua*, ao contrário do ácido acético. Porém em A1 verifica-se que também não existe nenhuma colónia de *Listeria innocua*, tal facto parece dever-se apenas à acção do ácido acético. Relativamente a 2 verifica-se o contrário, o ácido acético não possui o efeito fungicida do Delvocoat.

Para determinar o efeito do ácido acético na flora microbiana adicionada ao queijo de mistura, ou seja, para determinar que tipo de queijo (fresco/curado) iria usar para os testes na superfície dos queijos, testaram-se três leveduras (*Debaryomyces hansenii*; *Cândida spp.*; Levain (mistura de *Debaryomyces hansenii* e *micrococcus sp.* )) comumente adicionadas. Verificou-se que o ácido acético elimina também estas leveduras independentemente da concentração usada. Logo não poderia usar queijo fresco nos estudos preliminares porque estaria afectar a flora responsável pela maturação do queijo.

### 3.5- Análise em queijos

- Câmara (8-11°C; 89-95% humidade)

Neste estudo foram usados queijos com 8 dias. Como podemos ver pela tabela 12, os resultados foram bastante diferentes dos testes *in vitro*. Ao 5º dia ainda se nota um decréscimo de *Listeria innocua* com 2% de ácido acético, mas inesperadamente no 12º dia o controlo positivo ainda continha menos *Listeria innocua* do que com 2% de ácido acético, daí este teste ter sido suspenso. Como o queijo continua a sua maturação, pode explicar o decréscimo de *Listeria innocua* ao longo da maturação. E possivelmente os queijos imersos em ácido acético poderiam ter sido contaminados, ou então microrganismos desconhecidos poderiam estar a metabolizar o ácido e os produtos desta metabolização estarem a ser consumidos para o crescimento de *Listeria innocua*.

**Tabela 12-** Contagem de *Listeria innocua* (log UFC/cm<sup>2</sup>) na casca dos queijos tratados com 2% (v/v) de ácido acético, inoculados com *Listeria innocua*, e armazenados a 8-11°C durante 12 dias. O limite de detecção foi -0,6 log UFC/cm<sup>2</sup>.

Tratamento	Dias de contaminação		
	1 (9dias)	5 (14dias)	12 (20dias)
Negativo	-0,6	-0,2	0
Positivo	2,3	2	1
2% Ácido acético	2,3	1,8	1,6

Verificamos uma inibição de 1,3 log no controlo positivo e 0,7log com 2% ácido acético num período de 12 dias de cura.

- Estufa (27°C)

Para garantir o crescimento eficaz da *Listeria innocua*, novos queijos, desta vez com um dia, foram inoculados com *Listeria innocua* e bolores e, posteriormente colocados na estufa a 27°C. Como podemos verificar (tabela 13) o ácido acético é mais eficaz que a conjugação deste com o conservante comercial usado na fábrica (Delvocoat). Neste estudo aumentamos a concentração de conservante para 5%, visto que a 2% não eliminou *Listeria innocua*.

**Tabela 13-** Contagem de *Listeria innocua* (log UFC/cm<sup>2</sup>) na casca dos queijos tratados com 5% (v/v) de ácido acético e com Delvocoat, inoculados com *Listeria innocua* e bolores, e armazenados a 27°C por 13 dias.

Tratamento	Dias de contaminação	
	7 (8dias)	13 (14dias)
Negativo	0	0
Positivo	1,93	1,66
5% Ácido acético + Delvocoat	-0,4	0
Delvocoat	0,7	0
5% Ácido acético	0	0

Mostra que o ácido acético a 5% (v/v) tem propriedades anti-*Listeria* em queijos incubados em condições óptimas para a *Listeria*. No entanto, estas temperaturas não são usadas na maturação do queijo.

**Tabela 14-** Contagem de bolores (log UFC/cm<sup>2</sup>) na casca dos queijos tratados com 5% (v/v) de ácido acético e com Delvocoat, inoculados com *Listeria innocua* e bolores, e armazenados a 27°C por 13 dias.

Tratamento	Dias de contaminação	
	7 (8dias)	13 (14dias)
Negativo	0	0
Positivo	3,2	2,7
5% Ácido acético + Delvocoat	0,9	1,2
Delvocoat	3,2	2,9
5% Ácido acético	3,7	2,3

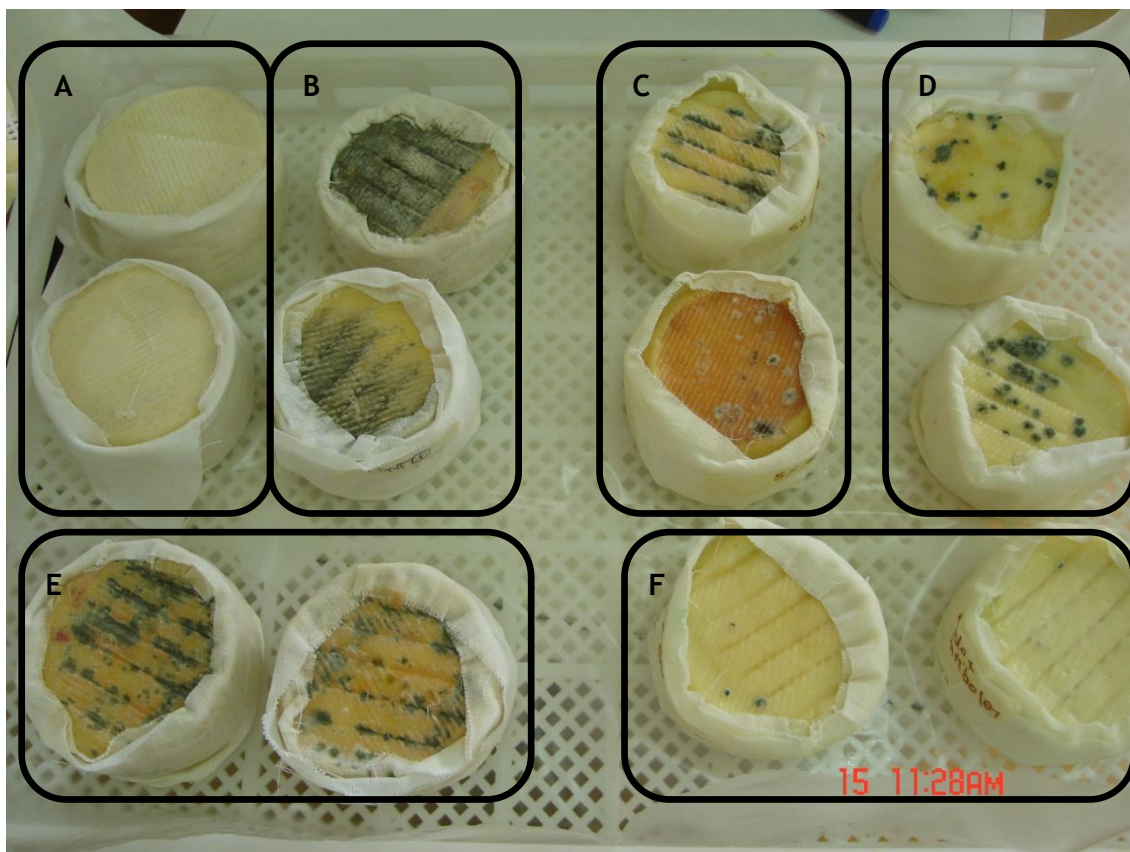
Pela tabela 14, verificamos que o produto usado diariamente na fábrica elimina os bolores eficazmente juntamente com o ácido, contrariamente ao ácido acético, que não parece inibir o crescimento de bolores nos queijos.

O Delvocoat é usado para eliminar os bolores, porém nesta experiência isso não se verificou. Este conservante é maioritariamente constituído por natamicina, que perde 10% da sua actividade entre os valores de pH 3,0 e 5,0. É neste intervalo de pH que o queijo se encontra durante os primeiros 13 dias de maturação. O queijo nos primeiros 13 dias tem uma descida de pH de 5,8 para 4,7. Também podia ter ocorrido uma recontaminação dos queijos por esporos dos bolores libertados dentro da estufa.

Verifica-se que há acção sinérgica entre o ácido acético e o Delvocoat para a eliminação dos bolores, já que o Delvocoat e o ácido acético reduziram 0,3 log e 1,4 log, respectivamente, enquanto que o ácido acético juntamente com o Delvocoat reduziram logo 2,3log nos primeiros sete dias de incubação.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos laboratorialmente, como podemos ver pela figura 12.

Aparentemente os queijos estavam de acordo com os resultados (figura 13).



**Figura 13** - Aspecto dos queijos, inoculados com bolores e *Listeria innocua* e incubados a 27°C. A- controlo positivo a 8°C; B- controlo positivo 27°C; C- 5% (v/v) ácido acético; D - Delvocoat; E- controlo negativo; F- 5% (v/v) ácido acético + Delvocoat.

Para além do Delvocoat, os queijos no final da maturação são sujeitos a outro conservante, o Vascoplast. Assim a experiência anterior foi repetida mas com este conservante, contudo não se obtiveram resultados, pois como foram usados os mesmos queijos, estes já se encontravam muito rijos e secos o que impossibilitou a implantação de *Listeria innocua* na superfície dos queijos.

- Câmara

Como os estudos realizados na estufa deram resultados favoráveis, foi repetido o estudo, nas mesmas condições na câmara de maturação, excepto que agora os ensaios decorrem a 8-11°C

e 89-95% de humidade relativa para expor os queijos às condições reais de maturação (tabela15).

**Tabela 15-** Contagem de *Listeria innocua* (log UFC/cm<sup>2</sup>) na casca dos queijos tratados com 5% (v/v) de ácido acético e com Delvocoat, inoculados com *Listeria innocua* e bolores, e armazenados a 8-11°C por 13 dias.

Tratamento	Dias de contaminação	
	7	13
Negativo	-0,5	0
Positivo	1,7	0,4
5% Ácido acético	1,5	1
5% Ácido acético + Delvocoat	1,8	1,5
Delvocoat	1,3	2

Mais uma vez os estudos na câmara foram contraditórios relativamente aos resultados obtidos *in vitro* e na estufa. Analisando a tabela 15, referente à *Listeria innocua*, não há diferenças significativas com adição de ácido acético ou Delvocoat. Inesperadamente, a redução de *Listeria innocua* com ácido acético não foi atingida tal como a 27°C na estufa. O Delvocoat não parece ter qualquer propriedade anti-*Listeria*.

Tais factos podem ser justificados pelo aumento de pH ao longo da maturação do queijo (tabela 16), pois como verificamos pelos ensaios do Bioscreen, o pH básico favorece o crescimento de *Listeria innocua*. Para além disso com o aumento de pH a concentração de ácido não dissociado diminui levando à diminuição da eficácia na eliminação da *Listeria*.

**Tabela 16-** Registo de pH ao longo dos dias de maturação do queijo.

Dia	1°	2°	7°	13°	15°	22°
pH do queijo	4,89	4,84	4,61	4,67	4,72	5,83
pH do queijo c/ ácido acético	-	-	-	4,66	4,69	5,72

Para além destas razões, Faleiro et al. (2003) verificam que estirpes de *Listeria monocytogenes* isoladas a partir de queijo, apresentam tolerância ácida quando cultivadas a pH5,5. Os microrganismos presentes no queijo tendem a ser mais tolerantes ao pH relativamente aos que estão presentes na carne ou o peixe, isso é reflexo do baixo pH do queijo relativamente aos outros alimentos. Contudo o intervalo de pH a que as estirpes de *Listeria monocytogenes* podem crescer é modificado pela baixa temperatura. Fernandes (2009) especifica que a temperaturas de refrigeração (4-10°C), o limite inferior de pH para o

crescimento de *Listeria* em alimentos tende a ser consideravelmente maior e, observou que quando é usado o ácido acético como acidulante, o limite inferior de pH é menor que 5,2.

Quanto aos resultados referentes aos bolores (tabela 17), é inexplicável que ao 14º dia o queijo que não foi contaminado tenha 2,6 log UFC/cm<sup>2</sup> comparativamente ao queijo que foi contaminado que só apresenta 0,7 log UFC/cm<sup>2</sup> de bolores. Tal facto pode dever-se a uma contaminação ambiental pelos esporos presentes no ar. E ao contrário do que era de esperar, o queijo com ácido acético é o que tem o maior valor.

**Tabela 17-** Contagem de bolores (log UFC/cm<sup>2</sup>) na casca dos queijos tratados com 5% (v/v) de ácido acético e com Delvocoat, inoculados com *Listeria innocua* e bolores, e armazenados a 8-11°C por 13 dias.

Tratamento	Dias de contaminação	
	7	13
Negativo	0,1	2,6
Positivo	1,5	0,7
5% Ácido acético	2,2	3,8
5% Ácido acético + Delvocoat	-0,5	0
Delvocoat	0	0

Neste ensaio o Delvocoat foi mais eficaz e o ácido acético parece não ter tido um efeito fungicida quando os queijos são colocados na câmara. Talvez o efeito de recontaminação dos queijos com esporos do ar expliquem os valores e a acção persistente do Delvocoat.

Geres et al. (2009) evidencia que o mecanismo exacto dos antimicrobianos muitas vezes não podem ser definidos, uma vez que existe uma complexa interacção entre os diferentes compostos produzidos durante o crescimento celular, podendo apresentar sinergia entre eles. Além disso, as diferenças na sensibilidade entre as espécies de bolores pode estar relacionada com a sua capacidade em alterar o metabolismo celular em resposta a condições de stress ácido.

### 3.6- Novos testes no Bioscreen

Visto que os resultados *in vitro* foram bastante eficazes para a eliminação de *Listeria*, após a dificuldade de justificar os resultados dos testes realizados na câmara, foram novamente realizados testes no Bioscreen, no qual foram testados apenas dois conservantes (ác. acético e ác. láctico) a concentrações mais baixas (0,5% - 3%) e num intervalo de pH semelhante ao do queijo (pH 4-6).

Como podemos observar pela figura 14, a percentagem de inibição diminuiu comparativamente com os primeiros resultados (figura 11). Pela análise desta figura verificamos que a 3 % de ácido acético a percentagem de inibição no segundo ensaio é cerca de 14% mais baixo que no primeiro. Contudo verifica-se que há medida que a concentração de conservante aumenta a percentagem de inibição também aumenta. Sendo o comportamento do pH quase irrelevante dentro da mesma gama de concentração.



Figura14 - Efeito do ácido acético no crescimento da *Listeria innocua*.

O mesmo se verificou com o ácido láctico (figura 15), apresentando uma redução de 16% na percentagem de inibição comparativamente aos primeiros ensaios (figura 10).

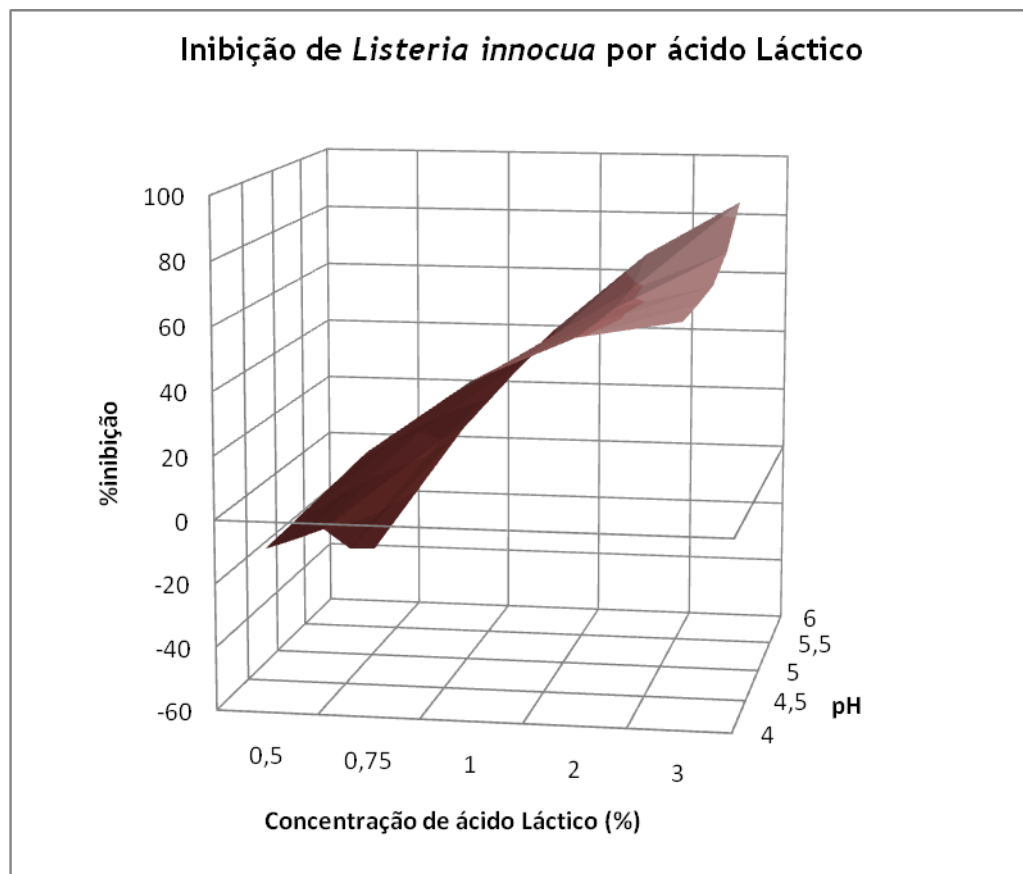


Figura 15 - Efeito do ácido láctico no crescimento da *Listeria innocua*.

Pela análise da figura 16, verifica-se que a partir do pH 5 o aumento da percentagem de inibição é consideravelmente maior em relação à *Listeria innocua*. Contudo verifica-se o mesmo comportamento na *Listeria monocytogenes* e na *Listeria innocua* face ao ácido acético, havendo um aumento na inibição há medida que a concentração de ácido aumenta a um pH constante. Porém as percentagens de inibição são menores.

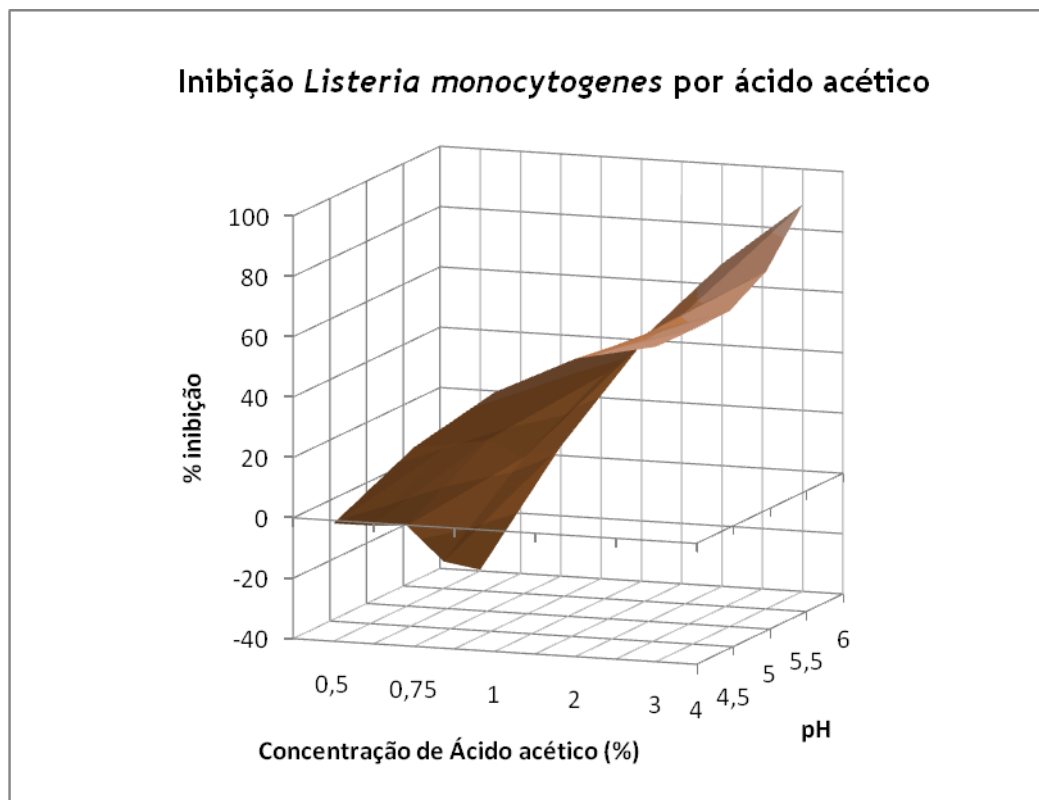


Figura 16 - Efeito do ácido acético no crescimento da *Listeria monocytogenes*.

Analisando o comportamento do ácido láctico na *Listeria monocytogenes* (figura 17), verifica-se que é diferente relativamente aos anteriores. A maior e menor percentagem de inibição é atingida a 0,5% de ác.láctico. A inibição é elevada em meio ácido e mais baixa em meio básico. O que leva a constatar que o efeito da inibição é devido ao pH e não ao ácido. Outra alteração observada é que o comportamento do ácido na *Listeria monocytogenes* não varia muito com o aumento da concentração, chegando mesmo a verificar-se uma diminuição da inibição à medida que aumenta a concentração. Contudo há uma excepção a pH 6, onde é observada a mesma tendência que nas figuras 14,15,e 16, onde a percentagem de inibição aumenta com o aumento da concentração. Este resultado não se enquadra com os restantes, nem com os valores de pH 4 e 6 que inicialmente inibiram em 74% e 43%, respectivamente o crescimento da *Listeria monocytogenes*.

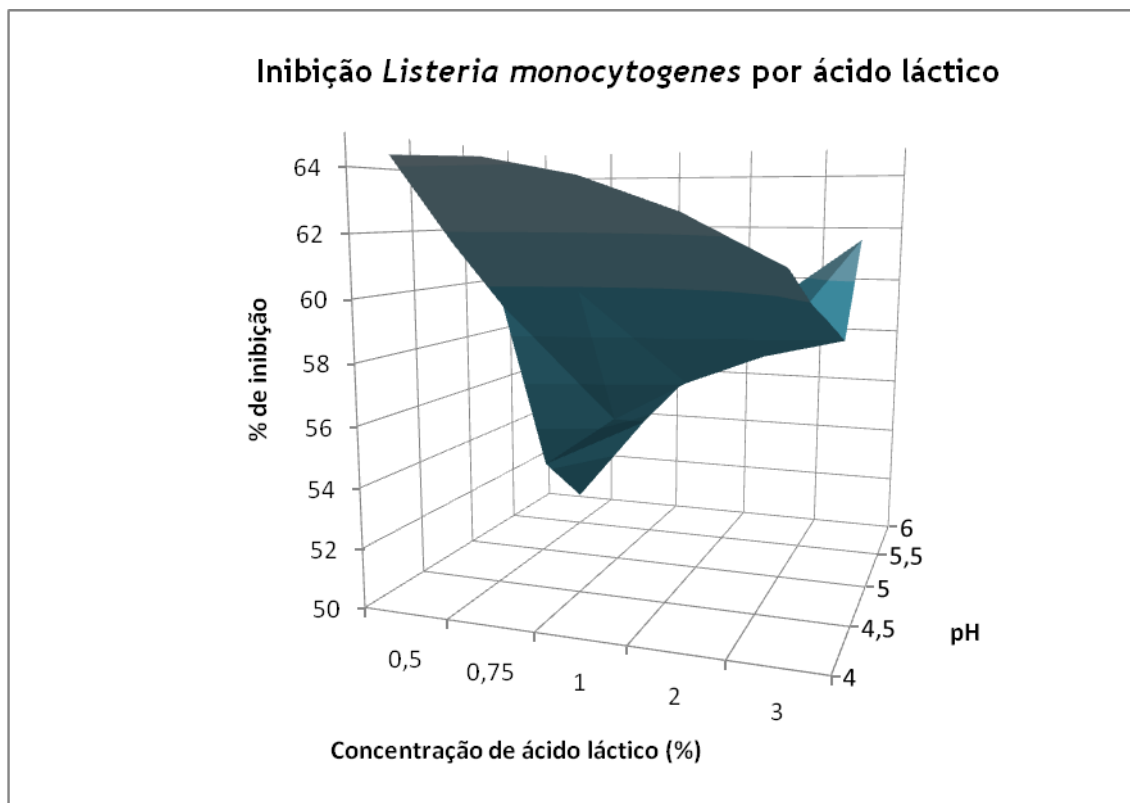


Figura 17 - Efeito do ácido láctico no crescimento da *Listeria monocytogenes*.

### 3.7- Análise sensorial/ Prova de queijos

Após a prova de queijos, os provadores não identificaram qualquer tipo de alteração no sabor ou aroma dos queijos que foram tratados com ácido acético. Tal facto possibilita o uso de ácido acético para eliminar as bactérias, nomeadamente a *Listeria monocytogenes*, que possam existir na superfície do queijo sem afectar as suas características.

## Capítulo IV

### 4.1- Conclusões Gerais

O objectivo global do presente trabalho era encontrar um conservante alimentar capaz de eliminar os microrganismos, especificamente a *Listeria monocytogenes* e os bolores, que aparecem esporadicamente durante a produção de queijo.

Assim obtiveram-se as seguintes conclusões gerais:

- A pH baixos (4 - 4,5) a percentagem de inibição da *Listeria innocua* e da *Listeria monocytogenes* é cerca de 70%.
- Cada conservante utilizado possui efeitos diferentes na eliminação da *Listeria innocua/ Listeria monocytogenes*.
- Todos os conservantes aumentam a percentagem de inibição relativamente à inibição provocada apenas pelo pH.
- O acetato de sódio foi o conservante menos eficaz na eliminação da *Listeria innocua*.
- O ácido acético parece ser o conservante mais eficaz na eliminação da *Listeria innocua*, pois foi o que apresentou maior inibição a concentrações baixas. Contudo quando aplicado nos queijos armazenados a baixas temperaturas o seu efeito não é muito pronunciado.
- O ácido acético a 5% apresenta propriedades anti-*Listeria* em queijos incubados a temperaturas óptimas de crescimento para a *Listeria*.
- O Delvocoat não parece ter qualquer propriedade anti-*Listeria*.
- O ácido acético não possui qualquer efeito na eliminação de bolores.
- A conjugação do Delvocoat e ácido acético parece ser promissora na redução de *Listeria innocua* e bolores.
- O ácido acético não altera o sabor e aroma do queijo.

## 4.2- Perspectivas Futuras

- Efectuar estudos em queijos com um tempo de maturação maior, com o objectivo de diminuir a interacção da flora microbiana com o conservante.
- Aplicar dois conservantes, por exemplo o ácido acético e o sorbato de potássio, afim de eliminar a *Listeria* e os bolores, respectivamente.
- Armazenar os queijos, depois de tratados, em embalagens estéreis, com o ambiente envolvente controlado, para reduzir o risco de contaminação por via aérea.

## Bibliografia

Aarnisalo, K., Raaska, L., & Wirtanen, G. (2007). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* in lubricants used in food industry. *Food Control*, 18, 1019-1025.

Adams, M.R., & Moss M.O. (2008). *Food Microbiology*. 3<sup>rd</sup> ed. The Royal Society of Chemistry; Cambridge,UK.

Apostolidis, E., Kwon, Y.I., & Shetty, K. (2008). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 317-324.

Arqués, J.L., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M., & Muñoz, M. (2005). Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 893-900.

Augustin, J.C., Zuliani, V., Cornu, M., & Guillier, L. (2005). Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1019-1042.

Aureli, P., Ferrini, A.M., Mannoni, V., Hodzic, S., Wedell-Weergaard, C., & Oliva, B. (2003). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 325-330.

Basílico, J. C., deBasílico, M.Z., Chiericatti, C., & Vinderola, C.G. (2001). Characterization and control of thread mould in cheese. *Applied Microbiology*, 32,419-423.

Belitz, H.D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. 4<sup>th</sup> ed. Springer; Heidelberg, Berlin.

Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., & Cogan, T.M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259-274.

Byelashov, O.A., Daskalov, H., Geornaras, I., Kendall, P.A, Belk, K.E., Scanga, J.A., Smith, G.C. & Sofos, J.N. (2010). Reduction of *Listeria monocytogenes* on frankfurters treated with lactic acid solutions of various temperatures. *Food Microbiology*, 27, 783-790.

Chen, J., Chen, Q., Jiang, L., Cheng, C., Bai, F., Wang, J., Mo, F. & Fang, W. (2010). Internalin profiling and multilocus sequence typing suggest four *Listeria innocua* subgroups

with different evolutionary distances from *Listeria monocytogenes*. *BMC Microbiology*, 10, 1471-2180.

Cheroutre- Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, J.C., & Lebert, A. (1998). Effects of pH or  $a_w$  stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 71-77.

Choi, S.H., & Chin, K.B. (2003). Evaluation of sodium lactate as a replacement for conventional chemical preservatives in comminuted sausages inoculated with *Listeria monocytogenes*. *Meat Science*, 65, 531-537.

Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A., & Degraeve, P. (2008). Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control*, 19, 982-989.

Comunicação pessoal por Dr<sup>a</sup> Patrícia Dinis, Cooperativa de Produtores de Queijos da Beira Beira - Idanha-a-Nova, CRL

Faleiro, M.L., Andrew, P.W., & Power, D. (2003). Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 207-216.

Felício, M.T.S., Hogg, T., Gibbs, P., Teixeira, P. & Wiedmann, M. (2007). Recurrent and Sporadic *Listeria monocytogenes* Contamination in Alheiras Represents Considerable Diversity, Including Virulence- Attenuated Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3887-3895.

Fernandes, R. (2009). *Microbiology Handbook Dairy Products*. Leatherhead Food International; Cambridge, UK.

Fernández-Salguero, J., & Sanjuán, E. (1999). Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. *Food Chemistry*, 64, 177-183.

Fox, E., Hunt, K., O'Brien, M., & Jordan, K. (2011). *Listeria monocytogenes* in Irish Farmhouse cheese processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 39-45.

Gallo, L.I., Pilosof, A.M.R., & Jagus, R.J. (2007). Effective control of *Listeria innocua* by combination of nisin, pH and low temperature in liquid cheese whey. *Food Control*, 18, 1086-1092.

Gameiro, N., Ferreira-dias, S., Ferreira, M., & Brito, L. (2007). Evolution of *Listeria monocytogenes* populations during the ripening of naturally contaminated raw ewe's milk cheese. *Food Control*, 18, 1258-1262.

Gandhi, M., & Chilindas, M.L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 1-15.

George, S.M., Metris, A., & Stringer, S.C. (2008). Physiological state of single cells of *Listeria innocua* in organic acids. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 204-210.

Gerez, C.L., Torino, M.I., Rollán, G., & Valdez, G.F. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, 20, 144-148.

González-Fandos, E., & Dominguez, J.L. (2007). Effect of potassium sorbate washing on the growth of *Listeria monocytogenes* on fresh poultry. *Food Control*, 18, 842-846.

Ho, A.J., Lappi, V.R., & Wiedmann, M. (2007). Longitudinal Monitoring of *Listeria monocytogenes* Contamination Patterns in a Farmstead Dairy Processing Facility. *J.Dairy Sci*, 90, 2517-2524.

Hof, H. (2003). Therapeutic options. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35, 203-205.

Huss, H.H., Jorgensen, L.V., & Vogel, B.F. (2000). Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 267-274.

Janssen, M., Geeraerd, A.H., Cappuyns, A., Garcia-Gonzalez, L., Schockaert, G., Van Houteghem, N., Verreken, K.M., Debevere, J., Devlieghere, F. & Impe, J.F.V. (2007). Individual and Combined Effects of pH and Lactic Acid Concentration on *Listeria innocua* Inactivation: Development of a Predictive Model and Assessment of Experimental Variability. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1601-1611.

Jay, J.M., Loessner, M.J., & Golden, D.A. (2005). *Modern Food Microbiology*. Seventh Edition. Springer; New York, USA.

Jeffrey, L.K. (2010). *Principles of Microbiological Troubleshooting in the Industrial Food Processing Environment*. Springer; New York, USA.

Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S., & Korkeala, H. (2003). Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria Monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 265-272.

- Makino, S.I., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y., Yamasaki, M., Yamamoto, S., & Igimi, S. (2005). An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 189-196.
- Marc, Y.L., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mofart, P., & Thuault, D. (2002). Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 219-237.
- Margolles, A., & Reyes-Gavilán, C.G. (1998). Characterization of plasmids from *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains isolated from short-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 231-236.
- Marth, E.H., & Steele, J.L. (2001). Applied Dairy Microbiology. Second Edition. Marcel Dekker; New York, USA.
- Miller, F.A, Ramos, B., Gil, M.M., Brandão, T.R.S., Teixeira, P., & Silva, C.L.M. (2009). Influence of pH, type of acid and recovery media on the thermal inactivation of *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 121-128.
- Neetoo, H., Ye, M., & Chen, H. (2008). Potencial antimicrobials to control *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged cold-smoked salmon pâté and fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 220-227.
- Pereira, C.I., Gomes, E.O., Gomes, A.M.P., & Malcata, F.X. (2008). Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture. *Food Chemistry*, 108, 862-868.
- Pereira, C.I., Graça, J.A., Ogando, N.S., Gomes, A.N.P., & Malcata, F.X. (2010). Influence of bacterial Dynamics upon the final characteristics of model Portuguese traditional cheeses. *Food Microbiology*, 27, 339-346.
- Perni, S., Aldsworth, T.G., Jordan, S.J., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., Tenreiro, R.P., Chambel, L., Zilhão, I., Barata, B., Adrião, A., Faleiro, M.L., Andrew, P.W., & Shama, G. (2007). The resistance to detachment of dairy strains of *Listeria monocytogenes* from stainless steel by shear stress is related to the fluid dynamic characteristics of the location of isolation. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 384-390.
- Pino, A., Prados, F., Galán, E., McSweeney, P.L.H., & Fernández-Salguero, J. (2009). Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International*, 42, 324-330.
- Ray, B., & Bhunia, A. (2008). Fundamental Food Microbiology. Fourth Edition. Taylor & Francis; Boca Raton, USA.

Ryser, E.T., & Marth, E.H. (2007). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Third Edition. Taylor & Francis; Boca Raton, USA.

Sallam, K.I. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, 18, 566-575.

Samelis, J., Sofos, J.N., Kain, M.L., Scanga, J.A., Belk, K.E., & Smith, G.C. (2001). Organic acids and their salts as dipping solutions to control *Listeria monocytogenes* inoculated following processing of pork bologna stored at degrees C in vacuum packages. *Journal of Food Protection*, 11, 1722-9.

Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., & Levin R.E. (2006). *Food Biotechnology*. Second Edition. Taylor & Francis; Boca Raton, USA.

Skalina, L.E., & Nikolajeva, V. (2010). Growth potential of *Listeria monocytogenes* strains in mixed ready-to-eat salads. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 317-321.

Smith, J., & Hong-Shum, L. (2003). *Food Additives Data Book*. Blackwell Science; Osney Mead, UK.

Stopforth, J.D., Yoon, Y., Barmpalia, I.M., Samelis, J., Skandamis, P.N., & Sofos, J.N. (2005). Reduction of *Listeria monocytogenes* populations during exposure to a simulated gastric fluid following storage of inoculated frankfurters formulated and treated with preservatives. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 309-319.

Stratford, M., Plumridge, A., Nebe-von-Caron, G., & Archer, D.B. (2009). Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 37-43.

Tavaria, F.K., Franco, I., Carballo, F.J., & Malcata, F.X. (2003). Amino acid and soluble nitrogen evolution throughout ripening of Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*, 13, 537-545.

Tejada, L., Abellán, A., Cayuela, J.M., Martínez-Cacha, A., & Fernández-Salguero, J. (2008). Proteolysis in goats' milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal*, 18, 139-146.

Theron, M.M., & Lues, J.F.R. (2011). *Organic acids and food preservation*. Taylor & Francis; Boca Raton, USA.

Vescovo, M., Scolari, G., & Zacconi, C. (2006). Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packet cold-smoked salmon. *Food Microbiology*, 23, 689-693.

Walstra, P., Wouters, J.T.M., & Geurts, T.J. (2006). Dairy Science and Technology. Second Edition. Taylor & Francis; Boca Raton, USA.

Whiting, R.C. & Bagi, L.K. (2002). Modeling the lag phase of *Listeria Monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 291-295.

Wo, Y., Griffiths, M.W., & Mckellar, R.C. (2000). A comparison of the Bioscreen method and microscopy for the determination of lag times of individual cells of *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology*, 30, 468-472.