

Efeito de Culturas Iniciadoras com Bactéria Ácido Lática sobre o Crescimento de *Listeria monocytogenes* em Lingüiça Frescal

Augustus Caesar Franke Portella¹, Raimundo Wagner de Souza Aguiar¹ e Gessiel Newton Scheidt¹

¹Departamento de Ciências Agrárias e Tecnológicas; Universidade Federal do Tocantins; 77402-970; Gurupi - TO - Brasil.

ABSTRACT

Fresh sausage products have been considered at low risk of causing listeriosis due to obstacles created in the manufacturing process and characteristics of pH, high salt concentration and presence of lactic acid bacteria. However, the survival of *Listeria monocytogenes* in these products is checked and process studies for the reduction of contamination by this pathogen, have demonstrated that characteristic as a variation of process parameters, strains of lactic acid bacteria and *L. monocytogenes* directly influence the results. In this study, two formulations were evaluated in vitro (a culture of *Lactobacillus plantarum* by adding 10^4 CFU mL⁻¹ culture of *L. monocytogenes* and the other with addition of *L. monocytogenes* and a starter culture of *L. plantarum* 0,0025%) using process parameters commonly used in Brazil. The sausages naturally contaminated had slight increase in population of *L. monocytogenes* at the beginning of the process, followed by reduction by the end of maturation. The sausages were spiked considerably reduced the count of *L. monocytogenes*.

Key words: *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum*, sausages

INTRODUÇÃO

Lingüiças mistas do tipo frescal são produtos de origem animal que apresentam alta atividade de água e, por serem altamente manipulados desde sua cadeia produtiva até a rede de distribuição no varejo pode conter microrganismos patogênicos. A disseminação de *Listeria monocytogenes* em plantas de processamento de lingüiça mista do tipo frescal é, ainda, pouco esclarecida, tornando-se relevante avaliar sua presença nesses produtos. Alguns autores (Destro, 1990; Silva et al., 2004) tem exaustivamente pesquisado a ocorrência de *L. monocytogenes* no produto final, porem ainda são poucos os estudos, no Brasil. Embora as carnes frescas apresentem, geralmente, baixas contagens de *L. monocytogenes*, à medida que aumenta seu grau de processamento, aumenta o risco de contaminação (Jay, 1996). Essa bactéria é o agente da listeriose, uma intoxicação alimentar

que apresenta alta taxa de mortalidade, período de incubação longo e predileção por pacientes imunodeficientes (Rocourt e Cossart, 1997). Atualmente é aceito que a principal forma de transmissão da listeriose é o consumo de alimentos contaminados (Who, 1988). Uma das maneiras encontrada para melhorar a segurança dos alimentos, é a utilização de microrganismos probióticos em sua formulação. O estudo do efeito antagônico de probióticos sobre a inibição de microrganismos patógenos tem demonstrado a capacidade das bactérias lácticas de produzir e tolerar uma concentração relativamente alta de ácido láctico. A denominação bactéria láctica, vem do fato de que a energia na forma de ATP é obtida através da fermentação de carboidratos, produzindo ácido láctico (CH₃-CHOH-COOH), como principal produto final. Entre as bactérias ácido-láticas, o *L. plantarum* é considerado um microrganismo

com potencial capacidade de inibição de outros microrganismos patogênicos (Leuschner e Boughtflower, 2002).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram adquiridas de forma aleatória, em supermercados, cinco amostras de lingüiça frescal provenientes de quatro fabricantes distintos, com qualidade e preços diferenciados, perfazendo um total de vinte amostras. Cada amostra, devidamente identificada, foi transportada para o laboratório de Processos Biotecnológicos, onde foram mantidas à temperatura de 4 °C durante uma semana, antes de serem processadas. Após esse período, foram colhidas assepticamente 25 g da porção central de cada amostra, transferidas para um saco Stomacher homogeneizador com 180 ml de água peptonada a 1 % com 0,85% de NaCl para promover a diluição da mistura. Após a homogeneização por dois a três minutos, o material liquefeito foi incubado a 35 °C durante 16 horas. A seguir, foram obtidas diluições subseqüentes até a concentração de 10^{-6} . De cada diluição tomaram-se alíquotas de 100 ml, que foram semeadas em placas de Petri (90,15mm) com o meio de cultura MRS (De Man et al., 1960) com 1,5% de ágar e 0,03% de azul de anilina, e incubadas em estufa a 37 °C por 48 horas. As cepas de bactérias lácticas têm a propriedade de assimilar o corante do meio, facilitando o reconhecimento das características morfológicas das colônias (Giraud, 1992). As colônias que cresceram, apresentaram forma característica e coloração azulada após esse período, foram selecionadas e semeadas por meio de semeadura

em placas de MRS ágar a 1,5%, procedendo-se a incubação a 37 °C por 24 horas. Cinco linhagens de *Lactobacillus*, Gram (+), catalase (-) e homofermentativos, foram caracterizadas como *L. plantarum* através de análise fenotípica - API 50CHL (BioMérieux). A análise morfológica e fenotípica das referidas linhagens, apresentou resultados com determinado grau de incerteza quanto à classificação taxionômica: três linhagens apresentaram probabilidade de identificação igual ou maior que 97,8%, e duas outras linhagens apresentaram probabilidade de identificação igual a 53% e 65,8% para *L. plantarum*.

A cultura de *L. monocytogenes* identificada como ATCC 7644 (OXOID C3970L) foi obtida no Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, foi ressuspensa em caldo Brain Heart Infusion-BHI (Oxoid) e incubada a 36 °C durante 16:00 horas. Após, a cultura foi transferida para o meio TSA-Trypticase Soy Agar (Oxoid) e mantido sob refrigeração. Para o uso, a cultura foi transferida para caldo BHI, incubada por 16:00 horas a 37 °C, e foi submetida à diluições decimais em 0,85% de solução salina estéril. A diluição contendo 10^4 UFC mL⁻¹ foi mantida sob refrigeração até o momento do uso.

Foram elaboradas duas formulações de lingüiça frescal (uma denominada controle, com adição da cultura de *L. monocytogenes* e outra com inoculação da cultura de *L. monocytogenes* e *L. plantarum* obtido do isolamento). Os ingredientes e suas proporções utilizadas na elaboração das amostras estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Formulação, em porcentagem, das amostras de lingüiça toscana com variação na concentração de sal, sendo C1 (Controle, com adição de cultura de *L. monocytogenes* e sem adição cultura *L. plantarum*), C2 (com adição de cultura de *L. monocytogenes* e *L. plantarum*).

% Ingredientes	C1	C2
Carne suína magra	80,50	80,50
Carne suína gorda	9,00	9,00
Antioxidante	0,89	0,89
Fécula de mandioca	0,89	0,89
Emulsificante	0,22	0,22
Pimenta branca	0,03	0,03
Alho	0,03	0,03
Água	7,07	7,07
Sal de cozinha (Na Cl)	0,07	0,07
Inóculo contendo <i>L. monocytogenes</i> (UFC mL ⁻¹)	$3.0 \cdot 10^4$	$3.0 \cdot 10^4$
Inóculo contendo <i>L. plantarum</i> (%)	0,00	0,025

Os ingredientes foram pesados em balança analítica para a obtenção de cada formulação. A carne suína foi previamente moída em disco de 3 mm e separada em três porções. Os condimentos foram adicionados e misturados a massa cárnea que em seguida passou pelo processo de cura por 12 horas, em temperatura controlada na câmara fria. Posteriormente, acondicionou-se a massa em placas de Petrí, simulando o embutimento e foram estocadas sob refrigeração a 4 °C.

Houve a necessidade de alguns substratos lácteos serem reconstituídos com água potável, posteriormente passaram por processo de aquecimento em banho-maria (90 °C/ 15 min) e resfriamento. Os substratos e o inóculo foram adicionados na lingüiça acondicionada nas placas de Petrí e a temperatura mantida à 4 °C. A partir deste tempo (t = 0) deu início a fermentação e foi retirado amostras a cada 24:00 horas, para que fosse monitorado o pH, a formação de ácido e o crescimento microbiológico meio MRS (AOAC, 1995).

A atividade de água (A_w) foi determinada utilizando-se do equipamento automático Aqualab e o pH foi determinado segundo o método oficial descrito no LANARA (1981).

Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as possíveis diferenças entre as médias ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa STATISTICA for Windows Realease 5.1 B (Statsoft, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a redução do pH nos três diferentes tipos de lingüiça, com cultura e sem cultura iniciadora na formulação.

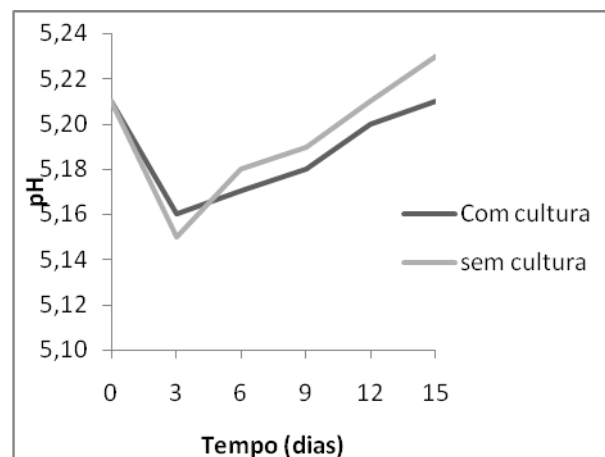


Figura 1- Evolução do pH durante o período de fermentação e maturação nas lingüiças frescas dos diferentes testes.

Observa-se na Figura 2 a diminuição da atividade de água nos dois tipos de lingüiças analisados.

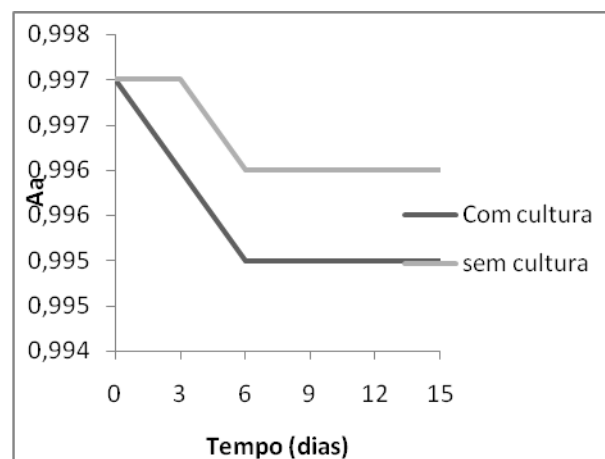


Figura 2- Queda da atividade de água durante o período de fermentação e maturação das lingüiças frescas dos diferentes testes.

Os resultados dos testes de teor de nitrito residual são apresentados na Figura 3.

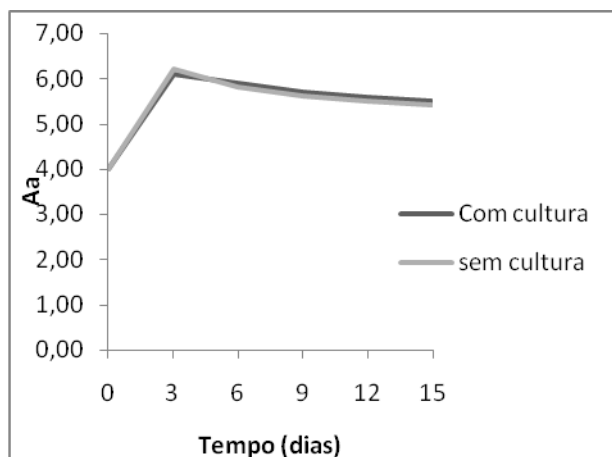


Figura 3- Nitrito residual durante o período de fermentação e maturação nas lingüiças frescas dos diferentes testes

O teste de índice de peróxidos manteve-se constante e igual a zero no decorrer do período de análise para as amostras com e sem cultura

iniciadora. A determinação qualitativa de rancidez oxidativa por reação de Kreiss (Osawa et al., 2005), cujo resultado positivo é caracterizado por uma coloração rósea no tubo de ensaio, mostrou um ligeiro aumento com o decorrer do tempo de armazenagem: no décimo terceiro dia de armazenagem foi detectada a rancidez da lingüiça sem cultura, enquanto que a lingüiça com cultura começou a exibir resultado positivo da reação de Kreiss no décimo quinto dia de armazenagem.

As Tabelas 2 e 3 apresentam os resultados das análises microbiológicas realizadas durante os períodos de fermentação, maturação e armazenagem sob refrigeração das lingüiças com e sem cultura iniciadora na formulação, respectivamente.

Tabela 2. Análises na lingüiça com cultura iniciadora contendo *L. plantarum*.

Tempo de fabricação (dias)	Bactérias Lácticas (UFC/g)	<i>L. monocytogenes</i> (UFC/g)	Ph	Aw	Nitrito Residual (ppm)
0	1,5.10 ³	3,0.10 ⁴	5,21	0,997	4,0
1	2,9.10 ³	3,3.10 ⁴	5,20	0,996	5,5
2	3,6.10 ³	3,8.10 ⁴	5,17	0,996	6,0
3	5,0.10 ³	4,3.10 ⁴	5,16	0,995	6,1
4	1,5.10 ³	4,7.10 ⁴	5,15	0,996	6,3
5	2,9.10 ³	5,2.10 ⁴	5,19	0,995	6,2
6	3,6.10 ³	5,5.10 ⁴	5,17	0,996	5,9
7	4,2.10 ³	5,4.10 ⁴	5,18	0,997	5,8
8	4,6.10 ³	5,4.10 ⁴	5,19	0,998	5,7
9	4,8.10 ³	5,5.10 ⁴	5,18	0,998	5,7
10	5,1.10 ³	5,7.10 ⁴	5,22	0,987	5,8
11	5,4.10 ³	5,9.10 ⁴	5,21	0,988	5,6
12	6,2.10 ³	6,0.10 ⁴	5,20	0,986	5,6
13	6,3.10 ³	6,2.10 ⁴	5,22	0,985	5,5
14	6,6.10 ³	6,1.10 ⁴	5,21	0,986	5,4
15	6,7.10 ³	5,9.10 ⁴	5,21	0,987	5,5

Tabela 3. Análises na lingüiça sem cultura iniciadora.

Tempo de fabricação (dias)	<i>L. monocytogenes</i> (UFC/g)	Ph	Aw	Nitrito Residual (ppm)
0	4,1.10 ⁴	5,21	0,997	4,0
1	3,5.10 ⁴	5,20	0,993	5,5
2	3,7.10 ⁴	5,17	0,996	6,0
3	5,1.10 ⁴	5,16	0,995	6,1
4	6,4.10 ⁴	5,15	0,994	6,3
5	7,1.10 ⁴	5,19	0,995	6,2
6	7,4.10 ⁴	5,17	0,993	5,9
7	7,8.10 ⁴	5,18	0,994	5,8
8	7,6.10 ⁴	5,19	0,997	5,7
9	7,5.10 ⁴	5,19	0,998	5,7
10	8,4.10 ⁴	5,22	0,997	5,8
11	9,8.10 ⁴	5,25	0,998	5,6
12	9,5.10 ⁴	5,22	0,997	5,6
13	9,2.10 ⁴	5,22	0,996	5,5
14	9,7.10 ⁴	5,21	0,996	5,4
15	9,6.10 ⁴	5,23	0,997	5,5

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o uso de culturas iniciadoras propicia processos de fermentação mais eficazes tornando-se essencial não somente para o controle de microrganismos deteriorantes e patogênicos, como para a manutenção da estabilidade físico-química e dos atributos sensoriais, proporcionando uma maior vida-de-prateleira e conservação dos aspectos de qualidade desejáveis na lingüiça tipo frescal, conferindo maior segurança ao produto final.

RESUMO

Lingüiças frescal têm sido consideradas produtos com baixo risco de provocar listeriose devido aos obstáculos criados no processo de fabricação e suas características de pH, alta concentração de sal e presença de bactérias lácticas. Entretanto, a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* nesta classe de produtos é verificada e estudos de processo para obter a redução da contaminação por este patógeno, têm demonstrado que particularidade como variação dos parâmetros de processo, cepas de bactérias lácticas e de *L. monocytogenes* influenciam diretamente os resultados. Neste estudo duas formulações *in vitro* foram avaliadas (uma com adição de 10⁴ UFC mL⁻¹ de cultura de *L. monocytogenes* e outra com adição de *L.*

monocytogenes e de uma cultura iniciadora de *Lactobacillus plantarum* 0,0025%) empregando parâmetros de processo comumente praticados no Brasil. As lingüiças naturalmente contaminadas apresentaram discreto aumento da população de *L. monocytogenes* no início do processo, seguidos por redução até o final da maturação. As lingüiças artificialmente contaminadas tiveram redução considerável da contagem de *L. monocytogenes*.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum*, lingüiça frescal

REFERÊNCIAS

A.O.A.C. - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (1995), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Cap, 39, 16-19.

Destro, M. T. Isolamento de *Listeria* spp. e estudo de sua ocorrência em carnes, leite e derivados. 1990. 73f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Giraud, E. Contribution a l'etude physiologique et ezimologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amyolytique isolee du mandioc fermenté. Thèse - Université de Provence, Aix-Marseille, 1992.

- Jay, J. M. (1996), Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. *Food Control*, **7**, 209-214.
- LANARA - Laboratório Nacional de Referência Animal, (1981), Métodos de análises oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Brasília, DF.
- Leuschner, G. K. R. and Boughtflower, P. M. (2002), Laboratory –Scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* Serovars Typhimurium, Enteritidis, and dublin. *Journal of Food Protection*, **65**, 508-514.
- Osawa, C. C.; Felicio, P. E.; Goncalves, L. A. G. (2005), Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: Métodos tradicionais, modificados e alternativos. *Química Nova*, **28**, 655-663.
- Rocourt, J. and Cossart, P. (1997), *Listeria monocytogenes*. In: Doyle, M. P.; Beuchat, L. R.; Montville, T. J. (Eds). *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. Washington : ASM. p. 337-352.
- Silva, W. P.; Lima, A. S.; Gandra, E. Á.; Araújo, M. R.; Macedo, M. R. P.; Duval, E. H. (2004), *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, **34**, 911-916.
- Statsoft, G. (1995). Inc. Statistica for Windows (computer program manual). Tulsa: Statsoft.
- WHO Working Group (1988), Foodborne listeriosis. Bulletin of the World Health Organization, **66**, 421-428.