



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

Actividade do vinho contra *Listeria monocytogenes* – comparação
de isolados alimentares com clínicos

por

Mário Filipe Gonçalves Fontoura

Janeiro 2012



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

Actividade do vinho contra *Listeria monocytogenes* – comparação
de isolados alimentares com clínicos

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Aplicada

por

Mário Filipe Gonçalves Fontoura

Orientação: Professor Doutor José António Couto
Professora Doutora Paula Teixeira

Janeiro 2012

Resumo

Diferentes serótipos de *Listeria monocytogenes* podem apresentar diferentes capacidades de reacção perante condições de *stress*, estando descrito que essa diferença pode estar associado à origem dos mesmos: seja essa origem alimentar ou clínica.

O vinho é uma solução complexa constituída por vários elementos com capacidade antibacteriana, estando reconhecida a sensibilidade de *L. monocytogenes* quando exposta à acção do vinho.

Este trabalho teve como objectivo comparar a actividade do vinho contra isolados alimentares e clínicos de *L. monocytogenes*, recorrendo, para tal, à elaboração das curvas de inactivação de 8 isolados clínicos e 8 isolados alimentares, após a exposição destas bactérias a vinho diluído numa proporção de 1:10 e 1:100.

Estudou-se também o efeito do vinho sobre *L. monocytogenes* em ambiente gastrointestinal simulado com duas matrizes alimentares diferentes: queijo fundido e uma papa de fruta para bebés.

Em vinho diluído 1:100 foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na cinética de inactivação, e conseqüentemente na resistência, dos diferentes isolados de *L. monocytogenes* estudados. Observou-se que estas diferenças estão relacionadas com a origem dos isolados. Com efeito, os isolados de origem alimentar mostraram-se mais sensíveis à acção do vinho do que os isolados clínicos. No entanto, quando se aumentou a quantidade de vinho nos ensaios (vinho diluído 1:10) não foram encontradas diferenças significativas relacionadas com a origem dos isolados ($p > 0,05$).

Quando foi simulado o ambiente gastrointestinal utilizando-se uma matriz de queijo fundido verificou-se que não ocorreu inactivação de nenhum dos isolados com ou sem vinho adicionado ($p > 0,05$). No entanto, quando a matriz alimentar foi constituída por uma papa de frutas, verificou-se uma maior sensibilidade das bactérias às condições gastrointestinais, sendo de realçar o efeito adicional de inactivação quando vinho foi adicionado. De facto, a inclusão de vinho no sistema gastrointestinal simulado levou a um aumento da inactivação dos isolados testados ($p < 0,05$) mais marcado nos isolados de origem alimentar do que nos clínicos.

Ficou assim demonstrada a grande sensibilidade de *L. monocytogenes* ao vinho, a qual que parece estar correlacionada com a origem dos isolados. Ficou igualmente demonstrado que a inclusão de vinho num ambiente gastrointestinal simulado pode

levar a um aumento da redução de células viáveis desta bactéria. Contudo, esse efeito é dependente da matriz alimentar presente, sendo que uma matriz alimentar com forte teor lipídico e proteico oferece uma maior protecção às células de *L. monocytogenes* que uma matriz com forte teor de hidratos de carbono.

Abstract

Different serotypes of *Listeria monocytogenes* may have different capacities to respond under conditions of stress, being reported that this difference may be linked to its origin.

Wine is a complex solution consisting of several elements which may exhibit antibacterial ability, being recognized the sensitivity of *L. monocytogenes* when exposed to wine.

This work aimed to compare the activity of red wine against clinical and food isolates of *L. monocytogenes*. Inactivation curves for 8 clinical isolates and 8 food isolates were obtained exposing the bacteria to diluted red wine (1:10 and 1: 100).

This work also aimed to study the effect of wine on *L. monocytogenes* in simulated gastrointestinal conditions with two different food matrices: a processed cheese and fruit meal for babies.

Significant differences ($p < 0,05$) were found in the kinetics of inactivation between food and clinical isolates when exposed to wine diluted 1:100.). In fact, food-borne isolates were found to be more sensitive to wine activity than the clinical isolates. However, when a lower wine dilution was used (1:10) no differences were observed related to the origin of the isolates ($p > 0.05$).

In the simulated gastrointestinal environment, only a slight inactivation level (< 1 log cycle) was observed for both tested isolates (one food and one clinical) when processed cheese was used as food matrix with or without added wine. However, when the food matrix was changed to a smashed fruit meal for babies, a strong decrease in the viable cell density was achieved, being also detected an additional inactivation effect provoked by wine.. In fact, the inclusion of wine in the simulated gastrointestinal system led to an increase in the inactivation of all the isolates tested ($p < 0.05$). This effect was more pronounced in food-borne isolate than in clinical isolate.

It was demonstrated the high sensitivity of *L. monocytogenes* to wine, such sensitivity seems to be correlated with the origin of the isolates. It was also shown that the inclusion of wine in a simulated gastrointestinal environment leads to a higher reduction of viable cells of this bacterium. However, the extent of this effect is dependent on the food matrix present. High fat and protein content foods exert higher protection than high carbohydrate content food matrices.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia dos Vinhos e Laboratório de Bactérias Láticas e Pescado, ambos da Universidade Católica Portuguesa – Escola Superior de Biotecnologia, Porto.

Agradeço ao Professor Doutor José António Couto, por toda a orientação, paciência e disponibilidade que sempre demonstrou, e que foram fundamentais na construção deste trabalho.

Agradeço à Professora Doutora Paula Teixeira, pela imprescindível ajuda na elaboração da análise estatística e pela sua sempre presente disponibilidade em aconselhar e auxiliar.

A todos os amigos do “4º e 5º piso”, pela amizade, companheirismo e indispensável apoio sempre demonstrados ao longo da elaboração deste trabalho.

Aos meus Pais, ao meu avô Mário e ao meu irmão, pelo apoio incondicional, sem o qual não teria sido possível a elaboração deste trabalho.

A todos um “muito obrigado”.

Índice

| | |
|--|----|
| Resumo | ii |
| Abstract | iv |
| Agradecimentos | vi |
| Lista de figuras | ix |
| Lista de tabelas | xi |
| 1 – Introdução | 1 |
| 1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> : caracterização e distribuição | 1 |
| 1.2 Listeriose | 5 |
| 1.3 Vinho: composição | 9 |
| 1.5 Vinho: características antibacterianas | 15 |
| 1.5 Acção antibacteriana do vinho | 19 |
| 1.6 Diferenças entre isolados clínicos e alimentares | 26 |
| 1.7 Objectivo | 27 |
| 2 – Material e Métodos | 28 |
| 2.1 Isolados <i>Listeria monocytogenes</i> e serotipagem | 28 |
| 2.2 Inóculos de <i>L. monocytogenes</i> | 29 |
| 2.3 Ensaio de inactivação com vinho | 29 |
| 2.4 Simulação do ambiente gástrico | 31 |
| 2.5 Simulação da passagem gastrointestinal | 31 |
| 2.6 Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> e análise estatística | 32 |
| 3 - Resultados | 33 |
| 3.1 Serotipagem dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> | 33 |
| 3.2 Curvas de inactivação em solução com vinho diluído 1:100 | 34 |
| 3.3 Curvas de inactivação em solução com vinho diluído 1:10 | 35 |
| 3.4 Simulação do ambiente gastrointestinal | 37 |
| 4 - Discussão | 43 |
| 4.1 Efeito bactericida do vinho sobre <i>Listeria monocytogenes</i> | 43 |
| 4.2 Diferenças entre isolados clínicos e alimentares na capacidade de resistência a condições adversas | 44 |
| 4.3 Ambiente gastrointestinal simulado | 46 |
| 5 - Conclusão | 50 |
| 6 – Trabalho futuro | 51 |
| Bibliografia | 52 |

Lista de figuras

Figura 1.1 – Micrografia, captada por microscópio electrónico de varrimento, de células de *L. monocytogenes* cultivadas a: a) 20°C (com grandes quantidades de flagelos) e b) 37°C (apenas resíduos de flagelos) (Peel *et al.*, 1988).

Figura 1.2 – Incidência de listeriose em 6 países da União Europeia em números de casos por 100 000 habitantes – 1999-2007 (Allerberger & Wagner, 2010).

Figura 1.3 – Efeito, em *Salmonella typhimurium*, de uma solução com: 0,15% de ácido málico; 0,6% ácido tartárico; 0,15% ácido málico e 0,6% ácido tartárico; 0,15% ácido málico, 0,6% ácido tartárico e 10% etanol, 0,15% ácido málico, 0,6% ácido tartárico e 15% etanol; 15% etanol a pH 6,5 e 15% etanol a pH 3 (Moretro & Daeschel, 2004).

Figura 3.1 – Curvas de inactivação dos diferentes isolados clínicos em solução contendo vinho diluído na proporção 1:100

Figura 3.2 – Curvas de inactivação dos diferentes isolados alimentares vinho diluído na proporção 1:100

Figura 3.3 – Curvas de inactivação dos diferentes isolados clínicos com vinho diluído na proporção 1:10

Figura 3.4 – Curvas de inactivação dos diferentes isolados alimentares vinho diluído na proporção 1:10

Figura 3.5 – Curvas de inactivação do isolado 2807, de origem clínica, em ambiente gástrico simulado (A), e ambiente gastrointestinal simulado (B) com uma matriz alimentar de queijo fundido

Figura 3.6 – Curvas de inactivação do isolado FSL-F7-01, de origem alimentar, em ambiente gástrico simulado (A), e ambiente gastrointestinal simulado (B) com uma matriz alimentar de queijo fundido

Figura 3.7 – Curvas de inativação do isolado 2807, de origem clínica, em ambiente gástrico simulado (A), e ambiente gastrointestinal simulado (B) com uma matriz alimentar de polpa fruta

Figura 3.8 – Curvas de inativação do isolado FSL-F7-01, de origem alimentar, em ambiente gástrico simulado (A), e ambiente gastrointestinal simulado (B) com uma matriz alimentar de polpa de fruta

Lista de tabelas

Tabela 1.1 – Exemplos de surtos internacionais de listeriose invasiva, 1980-2005 (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

Tabela 1.2 – Composição típica tanto dos vinhos de mesa e vinhos fino (% peso) (Soleas *et al*, 1997).

Tabela 1.3 – Concentrações médias mg/L de alguns compostos fenólicos encontrados no vinho (Soleas *et al*, 1997).

Tabela 1.4 – Concentração mínima inibitória (g/L) para vários microrganismos para 5 ácidos orgânicos comumente encontrados em produtos alimentares (Hsiao & Siebert, 1999).

Tabela 2.1 – Informação referente à origem dos isolados, com origem alimentar e clínica, utilizados neste trabalho.

Tabela 3.2 – Informação referente aos serogrupos dos isolados utilizados neste trabalho

1- Introdução

1.1– *Listeria monocytogenes*: caracterização e distribuição

Esta bactéria apresenta uma morfologia em bastonetes regulares e curtos com margens paralelas e extremidades achatadas, com dimensões de 0,4-0,5 μm por 1-2 μm . Geralmente surgem isoladas ou em cadeias curtas, sendo que em culturas velhas podem desenvolver filamentos com um comprimento superior a 6 μm . São bactérias gram-positivas não formadoras de cápsula nem esporos. (Whitman *et al.*, 2009).

A figura 1.1 mostra duas micrografias de células de *Listeria monocytogenes*, obtidas através de um microscópio electrónico de varrimento, encontrando-se evidenciado o efeito da temperatura na formação de flagelos (Peel *et al.*, 1988)

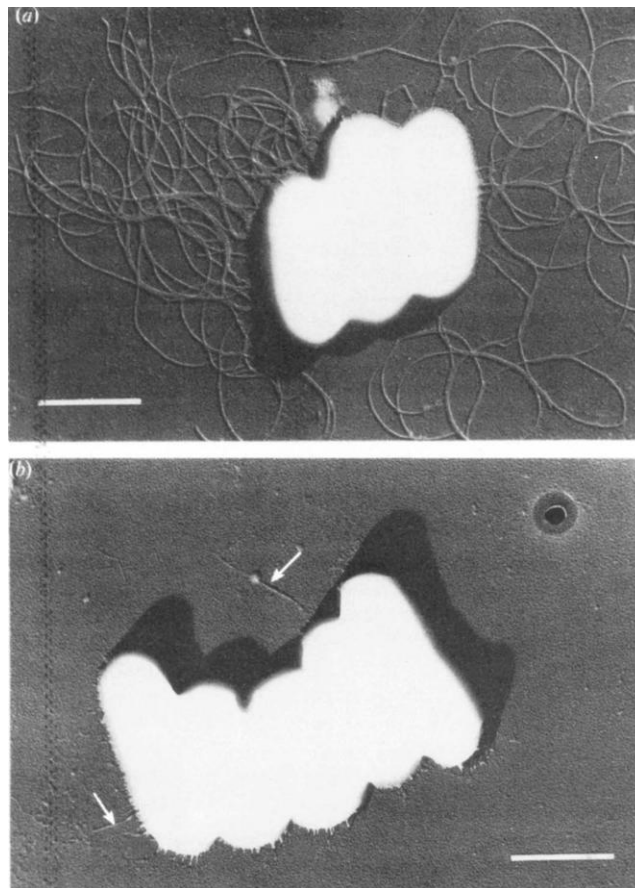


Figura 1.1 – Micrografia, captada por microscópio electrónico de varrimento, de células de *L. monocytogenes* cultivadas a: a) 20°C (com grandes quantidades de flagelos) e b) 37°C (apenas resíduos de flagelos) (Peel *et al.*, 1988).

L. monocytogenes apresenta metabolismo aeróbico e anaeróbico facultativo, e a catabolização da glucose resulta na produção de ácido láctico, ácido acético e outros produtos. É uma bactéria catalase positiva e oxidase negativa (Whitman *et al.*, 2009).

O género *Listeria* compreende seis espécies: as patogénicas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* e as não patogénicas *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. marthii*. (Bakker *et al.*, 2010). Destas, a que comumente provoca patologia no ser humano é *L. monocytogenes*. Enquanto que *L. monocytogenes* apresenta uma grande gama de hospedeiros, *L. ivanovii* parece estar mais restringida a ruminantes (Bernal *et al.*, 2006) apesar de, embora raramente, haver registo de casos de listeriose em humanos causados por *L. ivanovii* (Guillet *et al.*, 2010).

As estirpes de *L. monocytogenes* foram classificadas em três linhas evolutivas principais: a linhagem I, que engloba os serótipos 4b, 1/2b, 3c e 3b; a linhagem II que engloba os serótipos 1/2a, 1/2c e 3a e, por fim, a linhagem III que engloba os serótipos 4a e 4c (Wiedman *et al.*, 1997).

L. monocytogenes cresce numa ampla gama de alimentos que apresentam uma actividade da água relativamente alta ($A_w > 0,95$), e apresenta crescimento numa ampla gama de temperaturas (entre 0 e 45° C). O crescimento a temperaturas de refrigeração é relativamente lento, com um tempo de duplicação entre 1 a 2 dias (a 4°C). Para além do mais, esta bactéria sobrevive bem à congelação (Motarjemi & Adams., 2006). No entanto, células que se desenvolveram a 37° C apresentam maior resistência à congelação do que células que se desenvolveram a 4°C ou mesmo a 25°C (Azizoglu *et al.*, 2009).

A multiplicação de *L. monocytogenes* em alimentos encontra-se restrita a valores de pH compreendidos entre 5 e 9 (Motarjemi & Adams., 2006).

L. monocytogenes é encontrada ubiqüitariamente no ambiente e apresenta uma distribuição mundial, sendo isolada de fontes de água-doce, águas residuais, lamas e solo, especialmente quando matéria vegetal em decomposição está presente. Esta bactéria está presente numa ampla gama de animais (mamíferos, pássaros, peixes e invertebrados) de forma assintomática. No ser humano está presente assintomaticamente numa percentagem inferior a 1 % (Motarjemi & Adams., 2006).

Vários são os alimentos passíveis de transportar esta bactéria. De um conjunto de amostras vegetais analisadas na Catalunha, Espanha, 0,9% apresentavam-se contaminadas com *L. monocytogenes* (Badosa *et al.*, 2008). No Chile, de um total de 347 amostras de salada de vegetais, 88, (25,4 %), encontravam-se contaminadas. No

mesmo país, de um total de 216 amostras de vegetais preparados e vendidos prontos a ser consumidos 22 amostras (10,2%) estavam igualmente contaminados com *L. monocytogenes* (Cordano & Jacquet., 2009). Um estudo conduzido na Malásia revelou que 22,5 % de um universo de 306 amostras de vegetais prontos a comer com processamento mínimo, vendidos localmente, encontravam-se contaminados com *L. monocytogenes* (Ponniah *et al.*, 2009).

Após pesquisa de *L. monocytogenes* em carcassas de aves domésticas para consumo, adquiridas em mercados locais espanhóis, 32% revelaram a presença desta bactéria (Capita *et al.*, 2000). Por outro lado, um estudo semelhante realizado na Jordânia revelou uma contaminação de 50% das amostras (Osaili *et al.*, 2011). Num universo de 2177 amostras de diferentes alimentos recolhidos e examinados na província de Hebei, China, 4,13% estavam, contaminados com *L. monocytogenes*, sendo que o grupo que apresentava maior contaminação (10,32%) revelou ser os derivados de arroz (Neogi *et al.*, 2010).

De um universo de 36 lotes de *alheiras*, oriundos de 17 produtores do norte de Portugal, 60% revelaram contaminação por *L. monocytogenes* em concentrações superiores a 100 Unidade Formadoras de Colónias cfu/g (Ferreira *et al.*, 2005). Mais genericamente, dentro de 1035 amostras de variados alimentos, com origem em Portugal, 72% acusaram positivo para *L. monocytogenes*, sendo que a grande maioria dos produtos contaminados eram produtos crus – leite, carne, peixe e farinha – apesar de alguns alimentos processados terem também acusado positivo (Mena *et al.*, 2003).

Com efeito, esta bactéria foi detectada em produtos com origem em aves domésticas, carne de bovinos e carne processada (Jay., 1996), laticínios (Kozak *et al.*, 1996), ou vegetais (Badosa *et al.*, 2008).

Este microrganismo não é suficientemente resistente ao calor para resistir à pasteurização do leite, encontrando-se uma redução de 5,2 D quando submetido leite contaminado a uma temperatura de 71,7°C durante 15 s (Motarjemi & Adams., 2006).

Os biofilmes formados por *L. monocytogenes* podem aderir a materiais commumente usados na indústria alimentar, podendo possibilitar a contaminação de instalações de processamento alimentar durante longos periodos, aumentando o risco de contaminação cruzada de alimentos (Lunden *et al.*, 2002). Por exemplo, o chão das instalações de processamento de laticínios são um dos principais reservatórios de *L. monocytogenes* apesar de estas apresentarem, geralmente, na sua superfície um pH ácido. Visto que células envoltas em biofilme serem mais resistentes à temperatura,

químicos e agentes de higienização (Doyle & Beuchat., 2007) é possível que a adaptação a ambiente ácido por *L. monocytogenes* ocorra auxiliado pela produção de biofilmes (Robinson *et al.*, 2000).

Está demonstrado que uma suspensão de células, pré-adaptadas a condições ácidas consegue sobreviver 90 minutos numa solução de pH 3. A indução desta tolerância também protege *L. monocytogenes* contra outras causas ambientais de stress (Robinson *et al.*, 2000). Pan *et al.*, (2006), demonstrou que *L. monocytogenes* apresenta uma maior resistência a agentes de higienização vulgarmente usados na indústria alimentar – um agente com base de hipoclorito de sódio e um agente com base de peróxido de hidrogénio – quando envolta em biofilme, em contraposição com a fraca resistência que as mesmas células apresentam perante os mesmos agentes quando suspensas em solução líquida. No entanto a formação de biofilme é afectado por factores como temperatura, superfície de contacto e serótipos de *L. monocytogenes* (Bonaventura *et al.*, 2007).

Na realidade, *L. monocytogenes* não difere de outras espécies bacterianas na resistência aos desinfectantes: a persistência desta bactéria está mais relacionada com a dificuldade de desconectá-la dos locais onde estão refugiadas ou com a sua capacidade de crescer a baixas temperaturas (Carpentier & Cerf., 2011).

1.2 – Listeriose

Listeria monocytogenes é, na maior parte dos casos, a bactéria causadora de listeriose, uma infecção gastrointestinal, de origem alimentar, que leva ao desenvolvimento de septicemia e meningite (Madigan & Martinko., 2006).

A dose infecciosa de *L. monocytogenes* está estimada entre 10 e 100 milhões de unidades formadoras de colônias (cfu) em hospedeiros saudáveis, mas apenas entre 0,1 e 10 milhões de cfu em grupos de alto risco de infecção. Esses grupos compreendem imunocomprometidos, grávidas, recém-nascidos e a população com idade acima de 60 anos (Bortolussi., 2008), ou seja, a grande maioria de casos de listeriose ocorrem em indivíduos com uma condição subjacente que leva à supressão da imunidade mediada por células T (Farber & Peterkin., 1991). Esta bactéria é um patógeno intracelular que produz vários factores de adesão celular, hemolisinas (listeriolisina O e duas fosfolipases) e proteínas que vão mediar a motilidade de célula para célula (Murray *et al.*, 2002).

L. monocytogenes é a causadora de duas formas de listeriose: não invasiva e invasiva. Em indivíduos saudáveis, a forma não invasiva desenvolve-se como uma gastroenterite, com sintomas semelhantes a uma gripe, enquanto que em adultos imunocomprometidos pode manifestar-se a forma invasiva como meningite ou septicemia. A forma invasiva de listeriosa também pode ser adquirida pelo feto, através da placenta (Allerberger & Wagner, 2010). A forma não invasiva apresenta um tempo de incubação de 6-49 horas e os seus sintomas incluem diarreia, febre, dor abdominal, frio, dor de cabeça e mialgia. É uma doença auto-limitada com uma duração entre 27 a 42 horas e a maior parte dos doentes recuperam sem recorrer a terapia antibacteriana. (Douglas & Bronze, 2008).

Indivíduos com um sistema imunitário débil apresentam um risco maior de contraírem consequências severas devido à infecção por *L. monocytogenes*: dependendo do grupo de risco, as taxas de morte por listeriose estão compreendidas entre 10% e 50%, sendo que os recém-nascidos apresentam as maiores taxas de morte por infecção com esta bactéria (Bortolussi, 2008). O tempo de incubação médio da forma invasiva de listeriose está estimado, em média, em 3 semanas, no entanto surtos podem ocorrer entre 3 a 70 dias após exposição a produtos contaminados (Allerberger & Wagner, 2010).

A listeriose na gravidez manifesta-se como uma severa infecção sistêmica no feto ou no recém-nascido, assim como uma aparente gripe ligeira na grávida. A infecção pode ocorrer em qualquer estágio da gravidez, se bem que é raro a detecção de listeriose em crianças com mais de um mês, a não ser que exista alguma outra condição subjacente (Mclauchlin *et al.*, 2004).

Actualmente, o tratamento de eleição para infecções por *L. monocytogenes* é a utilização de um antibiótico β -lactâmico (p.ex. penicilina ou ampicilina), sozinho ou em combinação com um aminoglicosídeo (p.ex. gentamicina) (Hof, 2003).

A resistência de *L. monocytogenes* a antibióticos continua a ser relativamente baixa, isto apesar de um estudo envolvendo a análise de 120 isolados revelar que 11,7 % possuíam resistência a, pelo menos, um antibiótico (Conter *et al.*, 2008) e de, também, estarem reportados casos de resistência a antibiótico da família dos β -lactâmico desde 1988, principalmente devido ao uso deste tipo de antibióticos na indústria agro-pequária (Murray *et al.*, 2002).

O primeiro surto de listeriose identificado como tendo origem alimentar ocorreu em 1979 num hospital da cidade de Boston, Estados Unidos da América, tendo causado manifestações clínicas a 23 pacientes do hospital. Evidências epidemiológicas sugeriram uma associação da doença com o consumo de vegetais preparados no próprio hospital (Ramaswamy *et al.*, 2006).

No entanto, foi em 1981, no Canadá, que se mostrou pela primeira vez que os mesmos isolados presentes nos alimentos suspeitos eram os mesmos encontrados nos pacientes, identificando-se assim, inequivocamente, *L. monocytogenes* como um agente patogénico cuja infecção estava relacionada com a ingestão de alimentos contaminados (Ramaswamy *et al.*, 2006).

A partir de então a associação de listeriose à bactéria *L. monocytogenes* e à ingestão de alimentos contaminados foi subejamente concretizada e observada.

A tabela 1.1 revela alguns surtos de listeriose invasiva ocorridos a nível mundial entre 1980 e 2005, discriminando a localização do surto, o número de casos em período perinatal, número de fatalidades associadas, o alimento suspeito de ter sido o veículo de transmissão e o serótipo detectado (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007)

Tabela 1.1 – Exemplos de surtos internacionais de listeriose invasiva, 1980-2005 (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007)

| Ano | Localização | Nº de casos | Casos em período perinatal | Nº de fatalidades | Veículo de transmissão | Serótipo |
|------------|------------------------|--------------------|-----------------------------------|--------------------------|--|-----------------|
| 1981 | Nova Scotia, Canadá | 41 | 34 | 18 | Salada de couves | 4b |
| 1983 | Massachusetts, EUA | 49 | 7 | 14 | Leite pasteurizado | 4b |
| 1985 | Califórnia, EUA | 142 | 94 | 48 | Queijo ao estilo Mexicano | 4b |
| 1983–1987 | Suíça | 122 | 65 | 34 | Queijo | 4b |
| 1987–1989 | Reino Unido | 366 | ? | ? | Paté | 4b |
| 1989–1990 | Dinamarca | 26 | 3 | 7 | Queijo | 4b |
| 1992 | França | 279 | 0 | 85 | Língua de porco pronta a comer | 4b |
| 1993 | França | 38 | 31 | 10 | <i>Rillettes</i> | 4b |
| 1998–1999 | Múltiplos estados, EUA | 108 | ? | 14 | Cachorros quentes | 4b |
| 1999 | Finlândia | 25 | 0 | 6 | Manteiga | 3a |
| 1999–2000 | França | 10 | 3 | 3 | <i>Rillettes</i> | 4b |
| 1999–2000 | França | 32 | 9 | 10 | Língua de porco pronta a comer | 4b |
| 2000 | Múltiplos estados, EUA | 30 | 8 | 7 | Carnes de peru prontas a comer | 1/2a |
| 2000 | Múltiplos estados, EUA | 13 | 11 | 5 | Queijo ao estilo Mexicano | 4b |
| 2002 | Múltiplos estados, EUA | 54 | 12 | 8 | Carnes de peru prontas a comer | 4b |
| 2002 | Quebec, Canadá | 17 | 3 | 0 | Queijo feito de leite não pasteurizado | indeterminado |
| 2003 | Texas, EUA | 12 | ? | ? | Queijo | 4b |

A distribuição de casos de listeriose varia ao longo do ano, havendo uma maior incidência de casos nos meses de maior calor (ECDC, 2010).

Em 2009, 26, de um total de 27 Estados Membros da União Europeia (excluindo Portugal), reportaram 1 645 casos confirmados de listeriose, o que representou um aumento de 19% quando comparado com 2008. A taxa global de notificações era, no mesmo ano, de 0,4 casos por 100 000 habitantes, sendo que os países com maior taxa de notificação eram a Dinamarca e Espanha (EFSA, 2011). A incidência de listeriose, entre 1999 e 2007, em 6 países da União Europeia – Alemanha, República da Irlanda, Lituânia, Holanda, Espanha e Reino Unido – é apresentada na figura 1.2 (Allerberger & Wagner, 2010)

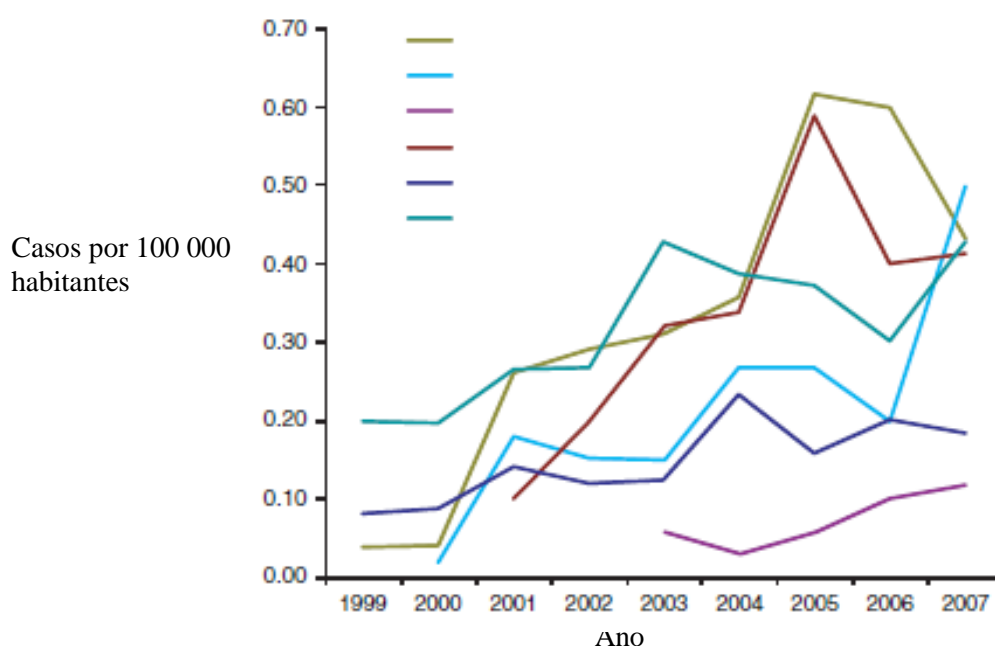


Figura 1.2 – Incidência de listeriose em 6 países da União Europeia em números de casos por 100 000 habitantes – 1999-2007 (Allerberger & Wagner, 2010)

Apesar de não ser uma doença de declaração obrigatória em Portugal, estima-se que a taxa de incidência de listeriose tenha sido, em 2003, de 1,4 casos por um milhão de habitantes, tendo sido reportada, dentro de um universo de 35 casos estudados, uma taxa de morte de 17 % (Almeida *et al.*, 2006).

1.3– Vinho: composição

Já foram identificados mais de 500 compostos no vinho, sendo que destes 160 são ésteres. A concentração da maior parte destes compostos situam-se entre 10^{-1} e 10^{-6} mg/L. Nestas concentrações os compostos individualmente tem uma baixa influência no perfil organoléptico do vinho, mas em conjunto adquirem uma influência bastante significativa (Frienman *et al.*, 2007)

O número de substâncias aromáticas com interesse organoléptico derivadas naturalmente das uvas são relativamente poucas quando comparadas com as que resultam do metabolismo das leveduras envolvidas no processo de fermentação. De uma maneira geral, os vinhos contêm entre 0,8 g e 1,2 g por litro de compostos aromáticos, ácidos voláteis e ácidos gordos esterificados. Carbonilos, fenóis, lactonas, terpenos, acetonas, hidrocarbonetos e compostos de nitrogénio e enxofre apesar de se encontrarem em concentrações baixas apresentam uma grande importância nas características sensoriais do vinho.

Uma relação sobre a composição típica, tanto dos vinhos de mesa como dos vinhos finos, está descrita na tabela 1.2 (Soleas *et al.*, 1997). Nesta tabela fica evidenciado que a maior diferença entre vinhos tintos e vinhos brancos é a concentração em compostos fenólicos. Por outro lado, a grande diferença entre vinhos de mesa e vinhos finos é a concentração em açúcares, sendo que nos segundos esta atinge concentrações muito mais elevadas.

Tabela 1.2 - Composição típica tanto dos vinhos de mesa e vinhos fino (% peso) (Soleas *et al.*, 1997).

| Compostos | Vinhos de mesa | | Vinhos finos | |
|---------------------------|----------------|-------|--------------|-------|
| | Branco | Tinto | Branco | Tinto |
| Água (por diferença) | 87 | 87 | 76 | 74 |
| Etanol | 10 | 10 | 14 | 14 |
| Outros compostos voláteis | 0,04 | 0,04 | 0,05 | 0,05 |
| Extractos | 2,6 | 2,7 | 10,1 | 12,2 |

| Compostos | Vinhos de mesa | | Vinhos finos | |
|---------------------|----------------|-------|--------------|-------|
| | Branco | Tinto | Branco | Tinto |
| Açúcares | 0,05 | 0,05 | 8 | 10 |
| Pectinas | 0,3 | 0,3 | 0,25 | 0,25 |
| Glicerol | 1,1 | 1,1 | 0,9 | 0,9 |
| Ácidos | 0,7 | 0,6 | 0,5 | 0,05 |
| Compostos fenólicos | 0,01 | 0,2 | 0,01 | 0,02 |
| Aminoácidos | 0,25 | 0,25 | 0,2 | 0,2 |
| Lípidos | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,02 |
| Vitaminas e outros | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| Cinzas | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Total | 100 | 100 | 100 | 100 |

No entanto são vários os factores que afectam a constituição química do vinho, tais como a exposição à luz solar; a temperatura – tanto a temperatura de fermentação como a temperatura média dos terrenos onde ocorre o crescimento e maturação das uvas – a concentração e nutrientes disponíveis durante o crescimento e maturação das uvas e a concentração de água – resultante da pluviosidade, rega ou outros factores – nas uvas. (Soleas *et al.*, 1997)

1.3.1 – Água

É o constituinte predominante das uvas e vinho e é fundamental no estabelecimento das características básicas dos mesmos. É um composto químico essencial que participa em muitas das reacções envolvidas no crescimento das uvas, fermentação do mosto e envelhecimento. Compostos insolúveis ou pouco solúveis apresentam pouco relevância na caracterização e produção de vinho (Soleas *et al.*, 1997). Encontra-se presente nas uvas com uma concentração variável entre 70% e 85%. (Webb, 1985)

1.3.2 – Ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos presentes nas uvas

São três os ácidos que contribuem predominantemente para a acidez do vinho: o ácido tartárico é um dos ácidos prevalentes nas uvas e no mosto, sendo um ácido relativamente forte que ajuda a conferir ao vinho um pH entre 3,0 e 3,5. De facto, no fim da fase de crescimento vegetativo, as concentrações de ácido tartárico nas uvas imaturas pode atingir um valor de 25 g/l. Em mostos provenientes de vinhas com origem em zonas frias a concentração pode atingir o valor de 6 g/l, enquanto em vinhas com origem em zonas mais quentes pode atingir uma concentração até 3 g/l, visto que a sua combustão é mais efectiva em temperaturas maiores. (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1999).

O ácido málico está presente nas uvas verdes em concentrações até 25 g/l. Aquando da maturação das uvas o conteúdo em ácido málico baixa para metade. Isto ocorre, em parte, devido à diluição resultante do crescimento das uvas, mas também por combustão. Mostos com origem em vinhas frias apresentam uma concentração entre 4 e 6,5 g/l de ácido málico, enquanto mostos com origem em vinhas de zonas quentes apresentam apenas concentrações entre 1 e 2 g/l. Por sua vez, o ácido cítrico é um ácido perfeitamente distribuído na natureza e a sua importância no ciclo de Krebs é sobejamente reconhecida. Encontra-se no mosto em concentrações que variam entre 0,5 e 1 g/l. (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1999).

Ácidos orgânicos com origem em processos fermentativos

Os principais ácidos produzidos por fermentação são: ácido pirúvico, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, ácido fumárico e ácido oxaloacético. De referir que o primeiro apresenta particular importância no metabolismo da célula, apesar das concentrações finais no vinho serem muito baixas, ou mesmo inexistentes (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1999).

A fermentação maloláctica é de extrema importância na produção de vinhos, devido à sua influência no produto final (Cardoso *et al.*, 2005). A fermentação maloláctica é uma fermentação secundária no processo de vinificação e é caracterizada pela conversão do ácido málico em ácido láctico e dióxido de carbono, sendo conduzida por bactérias do ácido láctico (Knoll *et al.*, 2011)

1.3.3 – Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são um grupo de compostos de particular relevância na caracterização do vinho tinto. A concentração destes compostos no vinho branco é muito menor. A presença de fenóis e compostos derivados pode afectar a aparência, sabor, fragrância e propriedades antimicrobianas do vinho. Estes compostos podem ter a sua origem na própria uva (película e grainhas), no metabolismo das leveduras ou serem extraídos aquando armazenamento em madeira. (Soleas *et al.*, 1997)

Quimicamente, o termo fenol refere-se a compostos com uma estrutura ciclo-benzeno com um ou mais grupo hidroxilo associado directamente à estrutura anelar. (Soleas *et al.*) A concentração total de fenóis varia entre 1800 e 4059 mg/L” Gallic Acid Equivalents” (GAE), tendo como média 2567 GAE mg/L para vinho tinto, e variando entre 165 e 331 GAE mg/L para vinho branco, apresentando neste caso uma média de 239 GAE mg/L. (Vaquero *et al.*, 2005)

Estão descritas 3 classes de fenóis que variam do relativamente simples para o complexo: não flavonóisis; flavonóis e taninos.

Os flavonóis constituem um grande grupo de metabolitos secundários originados em organismos vegetais (Vaquero *et al.*, 2005) e são caracterizados por possuírem 2 fenóis unidos por um pirano. Os flavonóides mais comuns são: flavonol; catequinas e, no vinho tinto, antocianinas. Pequenas quantidades de leucoantocianinas também são detectadas. Os flavonóides existem quer livremente quer associados a outros flavonóis, compostos fenólicos não flavonóides, hidratos de carbono ou uma conjugação destes compostos.

As antocianinas são moléculas com um ou dois resíduos de açúcar na sua constituição. As antocianinas desprovidas de resíduos de açúcar são denominadas antocianidinas, Nas uvas conhecem-se 5 antocianidinas: cianidina; peonidina; delphinidina; petunidina e malvidina. (Cardoso *et al.*, 2005)

Os estilbenos são caracterizados pela existência de dois anéis benzénicos ligados por uma cadeia de etileno. As películas contêm um estilbeno importante, o resveratrol. O resveratrol ocorre nos bagos na forma *trans*. A ocorrência do isómero *cis* em vinhos é devida à isomerização da forma *trans* proveniente da película dos bagos.

O resveratrol é uma molécula importante para o organismo humano na modulação da síntese do colesterol hepático, inibição da actividade de lipooxigenases, na protecção

das lipoproteínas de danos oxidativos e no efeito quimiopreventivo contra o cancro (Cardoso *et al.*, 2005).

Os flavonóis estão presentes principalmente na pele da uva e nas sementes. Antocianinas e flavonol são originados principalmente da pele da uva, enquanto que as catequinas e leucoantocianinas têm a sua origem predominante nas sementes da uva.

No vinho tinto os flavonóis constituem > 85% do conteúdo total de compostos fenólicos, o que representa uma concentração acima dos 1000 mg/L. Por seu lado, no vinho branco os flavonóis geralmente representa <20% do conteúdo total em compostos fenólicos, o que representa uma concentração média abaixo dos 50 mg/L (Soleas *et al.*, 1997)

Para além dos ácidos orgânicos, que contribuem predominantemente para a acidez das uvas também estão presentes ácidos fenólicos recorrentemente esterificados com um ou mais álcool. Este ácido constitui um sistema oxido-redutor que protege os compostos fenólicos da oxidação. É usado como um adjuvante do dióxido de enxofre. (Soleas *et al.*, 1997)

Os ácidos fenólicos são fenóis monómeros caracterizados pela presença de um grupo carboxilo ligado ao anel benzénico ou fazendo parte de uma cadeia carbonada igualmente ligada ao anel benzénico, como os ácidos cinâmicos. Destacam-se também os ácidos hidroxibenzóico, catéquito vanílico, gálico, *p*-cumárico, cafeico e ferúlico.

Na tabela 1.3 encontram-se as concentrações médias de alguns compostos fenólicos encontrados no vinho, sendo notório que o vinho tinto apresenta uma maior composição em compostos fenólicos que o vinho branco. (Soleas *et al.*, 1997)

Tabela 1.3- Concentrações médias mg/L de alguns compostos fenólicos encontrados no vinho (Soleas *et al.*, 1997)

| Compostos fenólicos | Concentração média (mg/L) | |
|---------------------|---------------------------|----------------|
| | Vinhos tinto | Vinhos brancos |
| Catequina | 191,3 | 34,9 |
| Miricitina | 8,5 | 0,0 |
| Epicatequina | 82,0 | 21,2 |
| Rutina | 9,1 | 0,0 |
| Ácido gálico | 95,0 | 6,8 |
| Quercetina | 7,7 | 0,0 |

| Compostos fenólicos | Concentração média (mg/L) | |
|---------------------|---------------------------|----------------|
| | Vinhos tinto | Vinhos brancos |
| Ácido cafeico | 7,1 | 2,8 |
| Ácido sinápico | 1,8 | 0,1 |
| Cianidina | 2,8 | 0,0 |

1.3.4 – Etanol

O mais importante e abundante álcool no vinho é o etanol. Em condições de fermentação *standard* este álcool pode atingir concentrações entre 14 e 15%, mas geralmente as concentrações de etanol variam entre 10 e 13%. Os principais factores que condicionam a concentração de etanol são a temperatura, concentração de açúcares e as estirpes de leveduras presentes na fermentação.

O etanol é crucial na estabilização do vinho, nos processos de envelhecimento e nas características organolépticas. À medida que a concentração de álcool aumenta durante o processo fermentativo é inibido o crescimento da maior parte dos microrganismos, permitindo à levedura *Saccharomyces cerevisiae* dominar o processo fermentativo. A actividade inibitória do etanol, juntamente com a acidez do vinho permite a conservação do vinho durante vários anos na ausência de oxigénio.

Durante a fermentação, o etanol funciona como um importante solvente na extracção de pigmentos e taninos. Também influencia o tipo e a quantidade de compostos aromáticos produzidos, afectando a actividade metabólica das leveduras envolvidas na fermentação.

Para além disso, o etanol actua como um reagente essencial na formação de compostos voláteis produzidos durante a fermentação, ou produzidos nos processos de envelhecimento ocorridos em recipientes de madeira. A capacidade do etanol de actuar como um solvente provavelmente reduz a taxa de evaporação dos compostos aromáticos durante a fermentação (Williams & Rosser., 1981)

Juntamente com outros álcoois, o etanol lentamente reage com os ácidos orgânicos dando origem a ésteres.

1.3.5 – Hidratos de carbono

Os principais açúcares presentes na uva são a glucose e a frutose, e ambos ocorrem em proporções semelhantes em uvas maduras. Por outro lado, em uvas que atingem um estado para lá da maturação apresentam frequentemente uma maior proporção de frutose.

As uvas de *Vitis vinífera* apresentam geralmente uma concentração de açúcares que varia entre 22-24° Brix (1° Brix=1% w/v) ou mais. Esta variação depende da casta, maturação e a própria saúde da vinha. A principal levedura envolvida na fermentação das uvas, a *Saccharomyces cerevisiae*, obtém a maior parte da sua energia através do metabolismo da frutose e glucose e está limitada na capacidade de fermentar outras substâncias.

Açúcares residuais em vinhos secos, geralmente numa concentração abaixo de 1,5 g/l, consistem principalmente em pentoses como arabinoses, ramnoses e xiloses. Os seus níveis podem aumentar ligeiramente durante a maturação em recipientes de madeira de carvalho pela quebra de glicosídeos da madeira ou pela síntese e libertação por leveduras.

Geralmente a doçura de um vinho é detectada a partir de níveis superiores a 1° Brix, mas a sua percepção é influenciada por outros constituintes como o etanol, ácidos orgânicos e taninos. (Willet, 1994)

1.4 – Vinho: características antibacterianas

O aumento das resistências de organismos patogénicos, tanto humanos como animais, juntamente com o aumento da preocupação dos consumidores sobre os usos de químicos como conservantes, tem conduzido, ao longo dos últimos anos, ao estudo de novos e eficazes produtos antimicrobianos sem efeito nocivo sobre a saúde humana. Nesse sentido tem ganho interesse o estudo das propriedades antimicrobianas de extractos fenólicos obtidos de plantas e frutos (García-Ruiz *et al.*, 2007) que podem ser usados como conservantes.

Os exactos mecanismos responsáveis pelo efeito antibacteriano do vinho ainda não estão completamente compreendidos (Moretro & Daeschel., 2004). Mas considerando-se que o vinho é uma solução complexa que contém vários componentes com potencial anti-microbiano, tais como: baixo pH, (entre 3,0 e 4,0); alta concentração

em ácidos orgânicos; concentração relativamente alta de etanol (entre 10% e 15%), altas concentrações de compostos fenólicos e, potencialmente, dióxido de enxofre, (até 300 ppm) (Waite & Daeschel., 2007) facilmente se percebe o seu alto potencial antimicrobiano.

1.4.1 – Ácidos orgânicos

Vários ácidos carboxílicos de baixo peso molecular são inibidores do crescimento microbiano. A eficácia de um determinado composto ácido depende do pH do alimento, visto este parâmetro determinar o grau de dissociação do ácido. A eficácia de um determinado ácido varia de espécie para espécie, por exemplo, a um determinado pH a eficácia antimicrobiana do ácido acético é maior que do ácido láctico, que por sua vez é maior que do ácido cítrico. (Atlas., 1997)

O grau de dissociação do ácido é o principal responsável pela capacidade inibitória do crescimento microbiano. O mecanismo de actuação destes compostos prende-se com a intervenção na síntese da parede celular dos organismos procaríotas, com a intervenção nos mecanismos genéticos ou nos mecanismos de síntese proteica. (Doyle & Beuchat., 2007).

As bactérias geralmente mantêm o pH interno perto da neutralidade para evitar mudanças conformacionais nas estruturas celulares, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e fosfolípidos. Na forma indissociada, os ácidos orgânicos podem penetrar na camada lipídica da membrana celular mais facilmente. Após a penetração, o ácido dissocia-se por força de o interior da célula apresentar um pH superior ao exterior. (Doyle & Beuchat., 2007).

No entanto outros factores que não apenas o grau de dissociação – factores como o número de grupos polares, o número de ligações duplas, o tamanho molecular do composto ácido e a capacidade de solubilização em solventes não polares – apresentam-se como cimeiros na diferenciação da eficácia antimicrobiana de diferentes ácidos orgânicos. (Hsiao & Siebert., 1999)

No entanto, e apesar de tradicionalmente se considerar que o interior das células bacterianas apresenta um pH alcalino – estas conclusões resumem os muitos anos de estudo sobre a bactéria *E. coli* – é agora evidente que muitos organismos bacterianos fermentativos podem acidificar ligeiramente o seu interior como resposta adaptativa ao aumento do pH extracelular. Quando o pH intracelular mantém-se próximo do alcalino,

na presença de um meio ácido, o gradiente de pH através da membrana pode-se tornar bastante alto. Daqui resulta que os prótons podem ser bombeados novamente para fora da célula mas ocorre uma acumulação dos aniões no interior das células. Ao permitir que o pH intracelular baixe ligeiramente, as bactérias deparam-se com um menor gradiente de pH (Immerseel *et al.*, 2007).

1.4.2 – Etanol

O etanol é um anti-séptico largamente usado para reduzir drasticamente o número de microrganismos em superfícies e materiais. Este composto desnatura proteínas, extrai os lípidos membranares (aumentando a permeabilidade da membrana celular) e actua como agente desidratante – factores que colaboram para a sua eficácia como agente anti-séptico. (Atlas., 1997) Este composto é usado comumente em concentrações entre 60% e 85% em água mas apresenta eficácia limitada contra esporos e alguns vírus (Madigan *et al.*, 2003). No entanto esporos de *Bacillus subtilis* quando em contacto com etanol mostraram-se invíveis (Loessner & Golden, 2005).

Apesar das capacidades antibacterianas deste álcool, quando apresentado nas concentrações encontradas geralmente nos vinhos, entre 10% e 15%, apresenta um efeito antibacteriano limitado quando comparado com o vinho em si (Moretto & Daeschel, 2004).

1.4.3 – Compostos fenólicos

A maior parte da pesquisa relacionada com a actividade bactericida dos compostos fenólicos está focada nos efeitos destes compostos na membrana citoplasmática. No entanto, é importante referir que provavelmente diferentes compostos fenólicos apresentam diferentes mecanismos de acção, isto pode estar relacionado com as diferenças estruturais e carácter lipofílico destes compostos (Campos *et al.*, 2008).

Com efeito, foi observado que ácidos hidroxicinâmicos induzem maior derrame de iões e maior influxo de prótons que ácidos hidroxibenzóicos (Campos *et al.*, 2009). Fenóis simples causam a disrupção da membrana citoplasmática e causam o vazamento dos componentes celulares (Doyle & Beuchat, 2007). Os compostos fenólicos também podem inibir directamente algumas proteínas celulares, com efeito, compostos como

ácido ferrúlico e cafeico demonstraram ter capacidade de inibir ATPases de *S.aureus*, sugerindo que estes compostos inibem directamente, por ligação, estas enzimas. (Muñoz *et al*, 1987). Para além do mais, 2,4-dinitrofenol inibe, não competitivamente, as enzimas associadas à membrana celular tanto de *E.coli* como de *Salmonella enteritidis* (Doyle & Beuchat, 2007).

Os extractos fenólicos exibem actividade contra *Streptococcus mutans* interrompendo mecanismos essenciais da sua virulência, (especialmente a actividade da glucosiltransferase), mas sem interromper a viabilidade deste organismo patogénico envolvido na formação de biofilmes dentários. (Thimothe *et al.*, 2007)

1.4.5 – Dióxido de enxofre

Apesar do dióxido de enxofre não ser um composto naturalmente presente de forma significativa em vinhos, é um composto usado ubiquitariamente na produção vitivinícola. Pode dizer-se que o dióxido de enxofre – SO₂ – vulgarmente conhecido como anidrido sulfuroso, é ainda hoje uma ferramenta insubstituível em Enologia. (Cardoso *et al.*, 2005)

Apesar dos seus inconvenientes organolépticos e toxicológicos, o SO₂ apresenta um conjunto de propriedades que nenhuma outra substância reúne em tão elevado grau: acção dissolvente; acção antioxidante e acção anti-séptica. A acção anti-séptica é uma das propriedades mais importantes do SO₂, que manifesta um alto poder antibacteriano e, em menor grau, sobre leveduras. (Cardoso *et al.*, 2005).

O efeito antibacteriano do SO₂ está relacionado com o pH, isto porque o dióxido de enxofre e os seus sais existem de acordo com o pH do ambiente. Soluções aquosas de enxofre teoricamente implicam a existência de ácido sulfúrico, mas na realidade, o que se observa é que à medida que o pH da solução aquosa decresce aumenta a concentração de SO₂.H₂O e diminui a concentração do ião HSO₃⁻. Na realidade é na forma de SO₂.H₂O que é conseguida a maior actividade antibacteriana, logo, quanto mais baixo o pH mais os compostos com dióxido de enxofre são eficazes no controlo microbiano. (Doyle & Beuchat, 2007).

Os mecanismos mais prováveis para a inibição por sulfitos incluem a disrupção da membrana citoplasmática, inactivação da replicação do DNA e da síntese proteica, inactivação das ligações membranares e de enzimas específicas, ou reacções com compostos individuais em diversas vias metabólicas (Doyle & Beuchat, 2007). Foi

sugerido que a capacidade antibacteriana do enxofre prende-se com a forte capacidade redutora do enxofre, o que reduz a disponibilidade de O₂ a ponto de inviabilizar o crescimento de organismos aeróbios, e inibindo o funcionamento de certas enzimas fundamentais (Loessner & Golden, 2005).

1.5 – Acção antibacteriana do vinho

Como já foi visto, o vinho é uma solução complexa constituída por vários elementos com capacidade antibacteriana. De facto, é reconhecida a capacidade anti-séptica do vinho contra variadas espécies bacterianas, sejam elas organismos causadores de cáries, organismos degradadores de alimentos ou organismos causadores de toxinfecções alimentares.

Com efeito, as propriedades do vinho como solução anti-séptica estendem-se tanto a bactérias Gram-negativas como Gram-positivas. No entanto, Jayaprakasha *et al.* (2003) observou que as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomona aeruginosa* são mais resistentes perante uma solução com extractos fenólicos provenientes de sementes de uvas que *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans* e *Staphylococcus aureus*.

A observação que as bactérias gram-negativas são mais resistentes a compostos fenólicos que as bactérias gram-positivas também foi efectuada por Pen *et al.* (2008) ao observar a elevada sensibilidade, quando comparada com organismos gram-negativos, de *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) perante extractos fenólicos de uva. Apesar do mecanismo de actuação destes extractos contra bactérias gram-positivas não estar bem esclarecido, estes autores depreendem que a síntese da parede celular é destabilizada pela presença destes compostos, numa acção semelhante à dos antibióticos β-lactâmicos, levando, assim à ruptura da parede celular. (Pen *et al.*, 2003). Esta possível maior sensibilidade das bactérias gram-positivas a extractos fenólicos também se observa quando comparando a sensibilidade destas bactérias com bactérias gram-negativas em soluções completas de vinho. (Moretro & Daeschel, 2004). Apesar da sensibilidade das bactérias gram-positivas parecer ser maior que a das gram-negativas Waite & Daeschel (2007) revelaram um estudo em que *S. aureus* revela-se mais resistente ao vinho que *E. coli* O157:H7, mostrando assim a vasta gama de respostas possíveis por parte de microrganismos perante uma solução de vinho.

O vinho tinto apresenta maior capacidade bactericida que o vinho branco, visto que, normalmente, estudos que testem paralelamente a resistência celular de bactérias

patogénicas a vinho tinto e a vinho branco, regularmente concluem que uma solução de vinho tinto consegue uma maior redução da viabilidade celular das bactérias. Por exemplo, *L. innocua* mostrou ser significativamente mais sensível ao vinho tinto que vinho branco (Fernandes *et al.*, 2006). Também está registada uma maior actividade bactericida contra *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, e *S. aureus* por parte do vinho tinto quando comparado com vinho branco (Moretro & Daeschel, 2004).

A proporção de vários compostos fenólicos (*cis* e *trans* resveratrol, ácido gálico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido ferúlico e ácido gentísico), na composição total em fenóis, foi avaliada em vinho tinto e vinho branco provenientes do Canadá, tendo-se evidenciado a tendência de o vinho tinto apresentar maiores níveis de *cis* e *trans* resveratrol, ácido gálico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido ferúlico e ácido gentísico. (Soleas *et al.*, 1997). Esta grande diferença na composição dos compostos fenólicos deverá ser a causa da diferença da capacidade antibacteriana entre vinho tinto e vinho branco. (Moretro & Daeschel, 2004).

Com efeito, a fracção fenólica dos vinhos mostra marcada actividade antibacteriana, indicando, assim, a sua contribuição na inibição do crescimento microbiano. Na determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de resveratrol contra *H. pylori* percebeu-se que essa concentração seria de 12.5 µg/mL. (Mahady & Pendland, 2000) Por outro lado a CMI contra *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, e *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou estar entre 171 e 342 µg/mL (Chan, 2002)

Vaquero *et al* (2005) revelou as diferentes reacções perante diferentes compostos fenólicos presentes no vinho por parte de várias bactérias patogénicas. Esses comportamentos foram estudados determinando a actividade microbiana dos microrganismos *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, perante diferentes compostos flavonóis, (rutina, quercetina e catequina), e compostos não flavonóis, (ácido gálico, ácido vanílico, ácido protocatecólico, ácido cafeico)

O ácido cafeico revela-se, dentro dos compostos citados, como único composto não-flavonol com efeito inibitório no crescimento de *S. marcescens*. Este organismo apresenta sensibilidade para todos os outros flavonóis – a partir de 1 mg/L para rutina, 2 mg/L para quercetina e 10 mg/L de catequina.

Sobre o crescimento de *P. mirabilis* o ácido cafeico também é apresentado com o único composto não flavonol com efeito inibitório, efeito verificável a partir de uma concentração de 100 mg/L. No que diz respeito aos compostos flavonóis, uma

concentração 100 e 1000 mg/L de quercetina e catequina, respectivamente, impõem-se como necessária para produzir inibição (Vaquero *et al.*, 2005)

A *E. coli* foi a bactéria mais sensível das citadas, visto ver o seu crescimento inibido a partir de 5 mg/L de ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico e ácido protocatecólico. Dentro dos compostos flavonóis foi registado que 50 mg/L de rutina ou quercetina produzem uma actividade antibacteriana moderada na *E. coli*. O mesmo efeito apenas foi observado com 1000 mg/L de catequina, indicando que esta bactéria é a que mais resiste a este composto flavonol (Vaquero *et al.*, 2005)

A *K. pneumoniae* foi inibida tanto pelo ácido gálico como vanílico, assim como por quercetina. No entanto, o ácido gálico foi mais eficaz do que o ácido vanílico na actividade bactericida contra este microrganismo, observando-se uma forte inibição celular a partir de uma concentração de 200 mg/L de ácido gálico – o mesmo efeito só foi observado com 500 mg/L de ácido vanílico. O mesmo grau de redução ocorre apenas com 100 mg/L de quercetina. (Vaquero *et al.*, 2005)

Quando testada a resistência de *E. coli* O157:H7 e *S. typhimurium* perante sumo de uva não fermentado, com origem em uvas Pinot Noir, revela-se que o primeiro organismo pode resistir até 12 dias e o segundo até 16 dias, apresentando ao fim destes períodos ainda células viáveis dos referidos organismos. No entanto, para sumo de uva com origem em uvas Chardonnay a *E. coli* O157:H7 pode sobreviver até 12 dias enquanto que *S. typhimurium* apenas resiste até aproximadamente 3 horas. Após estes valores não se conta células viáveis. Esta diferença pode ser explicada por um maior conteúdo ácido e baixo pH das uvas Chardonnay (7,6 g/L de ácido tartárico e 2,9, respectivamente) em relação às Pinot Noir (5,8 g/L de ácido tartárico e 3,52 respectivamente). Contudo, em vinhos produzidos a partir dos sumos de uva supracitados observa-se que, para ambos os vinhos, a *E. coli* O157:H7 apresenta um tempo máximo de sobrevivência de 60 minutos e a *S. typhimurium* um tempo máximo de sobrevivência de apenas 10 minutos. (Just & Daeschel, 2003). Estes autores clarificam que este efeito resulta maioritariamente pela presença de etanol no vinho e não no sumo de uva, notando que praticamente não existe diferença na acidez total do sumo de uva e dos respectivos vinhos.

O etanol é reconhecido pela sua capacidade de provocar danos na membrana celular, aumentando a sua permeabilidade. Esta mudança na permeabilidade da membrana celular pode facilitar a acção dos ácidos orgânicos e explicar assim a

diferença entre a actividade antibacteriana entre vinhos e sumos de uva. (Hardind & Maidment, 1996).

No entanto, a forte presença e variedade de ácidos orgânicos no vinho sem dúvida que influencia sobejamente a capacidade antibacteriana do vinho, seja ele tinto ou branco.

Os principais ácidos orgânicos no vinho (málico e tartárico), em combinação com etanol, exercem um efeito imediato na viabilidade celular de *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, e *S. aureus* (Moretro & Daeschel, 2004). *S. typhimurium* apresenta-se especialmente sensível na presença de vinho, tanto tinto como branco, não diluído, reduzindo a sua contagem de células viáveis em 7 ciclos logarítmicos em apenas 10 minutos. Tipicamente, pode-se esperar uma redução de 3 a 6 ciclos logarítmicos na contagem de células viáveis das referidas bactérias 10 minutos após a exposição ao vinho, sendo que a exposição ao vinho tinto leva a uma maior redução na contagem de células que o vinho branco (Moretro & Daeschel, 2004)

Tanto o ácido málico como o ácido tartárico apresentam forte actividade antibacteriana contra várias espécies bacterianas nas concentrações encontradas tipicamente nos vinhos. Na determinação da concentração mínima inibitória de vários ácidos orgânicos para *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli* *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum* encontraram-se os valores descritos na tabela nº 1.4 (Hsiao & Siebert, 1999)

Tabela 1.4- Concentração mínima inibitória (g/L) para vários microrganismos para 5 ácidos orgânicos comumente encontrados em produtos alimentares (Hsiao & Siebert, 1999)

| Microrganismo | Ácido Acético | Ácido Benzoico | Ácido láctico | Ácido málico | Ácido tartárico |
|---------------------|---------------|----------------|---------------|--------------|-----------------|
| <i>B. cereus</i> | 2,02 | 0,296 | 3,48 | 13,6 | 5,9 |
| <i>B. subtilis</i> | 0,105 | 0,192 | 8,32 | 26,1 | 26,1 |
| <i>E. coli</i> | 1,55 | 0,316 | 3,72 | 50,0 | 50,0 |
| <i>L. fermentum</i> | 26,3 | 2,5 | 25,3 | 25,0 | 25,0 |
| <i>L. plantarum</i> | 27,5 | 2,61 | 30,7 | 26,1 | 26,1 |

A capacidade inibitória dos ácidos orgânicos é evidente mas nem sempre ocorre em concentrações expectáveis de serem encontradas nos vinhos. No entanto a presença de outros compostos bactericidas aumentam a capacidade antibacteriana do vinho.

A figura 1.3 evidencia esse efeito sinérgico entre etanol e ácidos orgânicos, mostrando curvas de inativação de *Salmonella typhimurium*, na presença de ácido málico, etanol, ácido tartárico e várias misturas entre estes componentes. De notar que o maior efeito inibitório ocorreu quando se conjugou os diferentes ácidos orgânicos estudados com a maior concentração de etanol testada (15%), conseguindo-se uma redução de, pelo menos, 6 ciclos logarítmicos em apenas 10 minutos (Moretro & Daeschel, 2004).

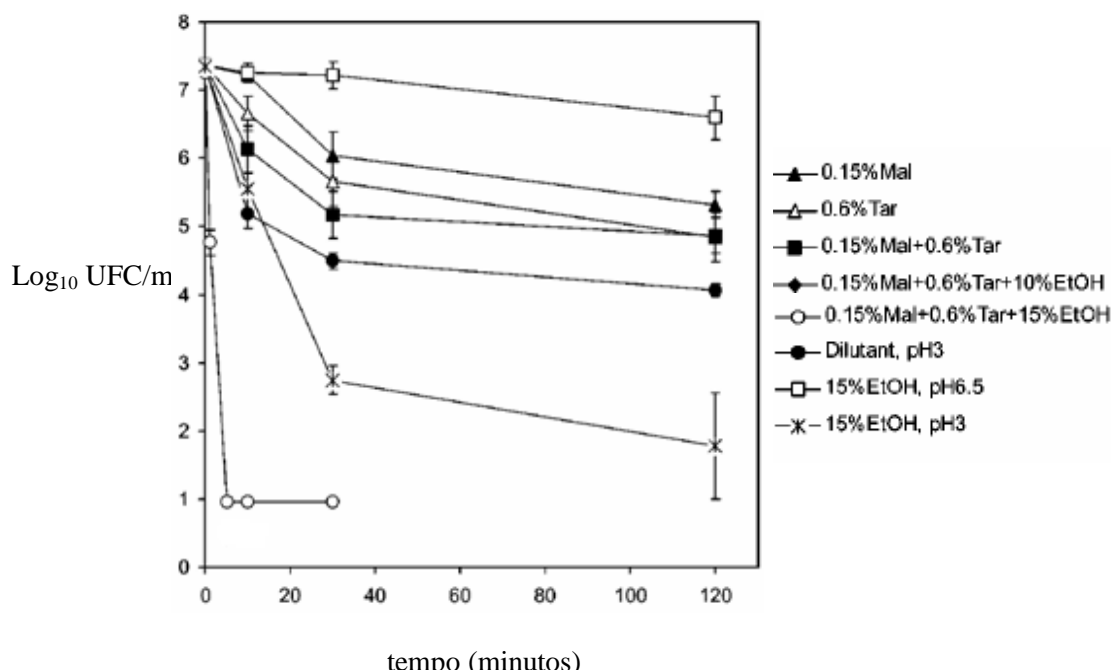


Figura 1.3 – Efeito, em *Salmonella typhimurium*, de uma solução com: 0,15% de ácido málico; 0,6% ácido tartárico; 0,15% ácido málico e 0,6% ácido tartárico; 0,15% ácido málico, 0,6% ácido tartárico e 10% etanol, 0,15% ácido málico, 0,6% ácido tartárico e 15% etanol; 15% etanol a pH 6,5 e 15% etanol a pH 3 (Moretro & Daeschel, 2004)

Um vinho de composição típica (pH=3,7; acidez titulável=6,4 g/L; concentração de dióxido de enxofre=27,9 ppm e 12% de etanol) revelou ser capaz de reduzir, em 20 minutos, 1 ciclo logarítmico uma cultura de *Staphylococcus aureus*. No entanto, vinhos com as mesmas características anteriormente descritas mas com pH de 3,03 e 2,84 conseguem uma redução em 20 minutos, respectivamente, de aproximadamente 4 e 6 ciclos logarítmicos sobre *S. aureus*. Dentro de um conjunto de factores como o pH, acidez titulável, dióxido de enxofre molecular e etanol, o factor mais importante na inativação de *S.aureus* revelou-se ser o pH, sendo seguido pela concentração de dióxido de enxofre molecular; acidez titulável e etanol. No estudo citado não foi

avaliada a interferência de outros compostos do vinho, como, por exemplo, os compostos fenólicos. (Waite & Daeschel, 2007)

Por outro lado, Boban *et al.*, (2010) manipulou a composição de uma solução de vinho tinto, analisando a actividade antibacteriana contra *S. enterica* e *E.coli* do vinho completo, do vinho desprovido de compostos fenólicos e do mesmo vinho sem álcool. Analisou, em paralelo, uma solução de ácido tartárico e málico, álcool e uma combinação de ambos, nas mesmas concentrações presentes no vinho analisado. As soluções que mais contribuíram para a inactivação dos referidos organismos foram, por ordem decrescente, o vinho inteiro, o vinho desprovido de compostos fenólicos, o vinho desprovido de álcool, a solução de etanol com os ácidos orgânicos, a solução apenas com ácidos orgânicos e, por fim, a solução apenas com álcool.

Assim, percebe-se que apesar de o vinho ser uma solução onde estão presentes vários compostos com actividade antimicrobiana, esses diferentes compostos não vão contribuir de igual maneira na actividade antibacteriana do vinho. Na verdade, a soma dos efeitos antibacterianos dos compostos individuais do vinho não é necessariamente igual ao efeito antibacteriano total do vinho em si. Por exemplo, uma solução de 15% de etanol não traduz o efeito de um vinho com igual concentração em álcool (Hardind & Maidment, 1996).

A actividade antibacteriana de soluções complexas como o vinho não pode ser exclusivamente atribuídas aos seus componentes fenólicos ou não fenólicos, nem pode essa mesma actividade ser prevista com base na análise quantitativa dos compostos individuais (Boban *et al.*, 2010). O vinho deve ser considerado como um todo, onde diversos compostos interactuam na obtenção do desejado efeito antimicrobiano.

Para além do mais, o mesmo composto pode reagir de forma diferente em organismos diferentes.

De notar que tanto *S. enteritidis* como *E. coli* são bactérias incluídas na família *Enterobacteriaceae*, logo bastante perto filogeneticamente quando comparadas com outros organismos patogénicos. No entanto a diferença de tempos entre as curvas de inactivação referentes ao vinho inteiro e à solução de etanol com pH 3,1 já é bastante significativa. Daqui se percebe que, apesar do forte efeito bactericida do vinho, esse efeito não ocorre pelas mesmas razões em todos os microrganismos sensíveis ao vinho nem nas mesmas proporções.

A capacidade antibacteriana do vinho foi revelada quando usado em marinadas. Com vinho tinto, folhas de orégão, extracto de alho e 0,05% de óleo de orégão,

consegue-se instantaneamente uma redução total de uma suspensão de *Listeria monocytogenes* com concentração inicial de 10^5 cfu/mL, o vinho sozinho demorou 30 minutos a conseguir o mesmo efeito. Em 60 minutos, marinadas demonstraram igualmente serem activas contra *B. cereus* e *E.coli* (Friedman *et al.*, 2007) .

Está demonstrado que uma solução de vinho diluída 1:2 (v/v) reduz uma suspensão de *Campylobacter jejuni*, com uma concentração inicial de $10^6 - 10^7$ cfu/ mL, para níveis indetectáveis em menos de 50 segundos. Mesmo quando a diluição é de 1:4 a diminuição na contagem de células viáveis é bastante significativa. Esta redução está primeiramente relacionada com a presença de ácidos orgânicos e com o pH do vinho tinto. Com efeito, observa-se a inactivação de *C. jejuni* em 20 minutos quando exposta a um modelo gástrico *in vitro* – modelo que contempla a presença de uma matriz alimentar e fluído gástrico sintético – com 100 ml de vinho. (Carneiro *et al.*, 2007). Carneiro *et al.* (2007) também demonstrou que o vinho tinto afecta a viabilidade de *C. jejuni* mais efectivamente que o vinho branco, tendo notado que apesar de o álcool ser um factor importante nessa inactivação, a presença de compostos fenólicos potencia esse efeito, nomeadamente o ácido hidroxibenzóico e gálico, salientando-se e explicando-se assim, uma vez mais, a diferença da resposta constatada entre vinho branco e tinto.

Também *S. typhimurium* e *E. coli* O157:H7 mostraram ser sensíveis, *in vitro*, a uma solução de vinho incluída num modelo gástrico. (Just & Daeschel, 2003).

1.6 – Diferenças entre isolados clínicos e alimentares

Está reportado que diferentes serótipos de *Listeria monocytogenes* comportam-se de diferente maneira perante factores que podem causar inactivação celular, por exemplo, o serótipo 1/2a tende a ser mais resistente a duas bacteriocinas com actividade anti-listeria que o serótipo 4b (Buncic *et al.*, 2000).

Quando comparada a resistência de isolados clínicos e alimentares de *L. monocytogenes* em ambiente gastrointestinal simulado, observou-se que a resistência era dependente da origem, sendo que isolados clínicos tendencialmente são mais resistentes que isolados alimentares (Ramalheira *et al.*, 2010)

O mesmo foi observado quando comparada a resistência de isolados alimentares e clínicos aos efeitos desfavoráveis das condições de armazenamento, tendo-se uma vez mais observado uma maior resistência por parte dos isolados clínicos que dos isolados alimentares (Avery & Buncic, 1997). Foi observado também que existe diversidade na resistência ao calor por parte de diferentes estirpes de *L. monocytogenes*, sendo que os isolados de origem clínica foram, uma vez mais tendencialmente, mais resistentes ao stresse provocado por aquecimento que os isolados de origem alimentar (Felício *et al.*, 2011).

Efectivamente, quando se modela factores como baixas temperaturas e pH, encontraram-se diferenças significativas na cinética de crescimento de isolados clínicos e isolados de *L. monocytogenes*, tendo os isolados ambientais revelado serem mais sensíveis a estes factores que os isolados clínicos (Viallette *et al.*, 2002).

1.7 – Objectivo

Está reportado que o vinho pode levar a uma redução entre 4 a 5 vezes de uma população de *Listeria innocua* (substituto de *L. monocytogenes*) em condições ácidas. Assim, a ingestão de vinho durante uma refeição pode ajudar a prevenir o desenvolvimento de uma toxi-infecção causada por *Listeria*. (Fernandes *et al*, 2006).

No entanto, como já foi referido, diferentes serótipos comportam-se de diferente maneira perante factores antibacterianos. Com efeito, a comparação do comportamento de estirpes bacterianas de origem clínica com estirpes ambientais pode ser uma valiosa ferramenta para avaliação do risco, principalmente de patogénicos alimentares (Viallette *et al*, 2002).

Nesse sentido, este trabalho procura comparar a actividade do vinho contra isolados alimentares e clínicos de *Listeria monocytogenes*, recorrendo, para tal, ao estudo das curvas de inactivação de 8 isolados clínicos e 8 isolados ambientais, conduzidas com vinho diluído numa proporção de 1:10 e 1:100

Também foi objectivo deste trabalho o estudo do efeito do vinho, sobre *L. monocytogenes*, consumido durante uma refeição, tendo-se, para este fim, realizado uma simulação *in vitro* do processo digestivo em duas matrizes alimentares diferentes: queijo fundido e uma papa de fruta para bebés.

2 – Material e Métodos

2.1 – Isolados *Listeria monocytogenes* e serotipagem

Neste trabalho foram utilizados oito isolados de origem clínica e oito isolados de origem alimentar pertencentes à coleção de culturas de *Listeria monocytogenes* da Escola Superior de Biotecnologia – Universidade Católica Portuguesa. A tabela 2.1 discrimina a origem de cada um dos isolados estudados.

Os isolados de *L. monocytogenes* foram genoserotipados por multiplex-PCR, utilizando a metodologia descrita por Doumith *et al.* (2004).

Tabela 2.3 – Informação referente à origem dos isolados, com origem alimentar e clínica, utilizados neste trabalho

| Isolados clínicos | | Isolados alimentares | |
|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
| Referência do isolado | Origem (Hospital) | Referência do isolado | Origem (Alimento) |
| 2541 | Almada | FSL-F7-88 | Alheira |
| 2693 | Lisboa | FSL-F7-20 | Alheira |
| 2694 | Lisboa | FSL-F7-01 | Alheira |
| 2792 | Braga | 2589 | Alheira |
| 2793 | Braga | 2619 | Paínho |
| 2797 | Porto | 2653 | Linguíça |
| 2798 | Porto | 2796 | Queijo |
| 2807 | Lisboa | 2801 | Rissóis |

Os isolados foram cedidos em placas de TSA-YE e transferidos para rampas de TSA-YE (30 g/l de TSB (Biokar Diagnostics, Beauvais, França), 15 g/l de agar

bacteriológico (Liofilchem S.R.L., Italia) e 6 g/l de extracto de levedura (Becton, Dickinson and Company, Le Point de Claix, França), tendo sido incubados por 18 horas a 37°C. Após este período, foram mantidos a 4°C. Os isolados foram bimensalmente repicados para novas rampas de TSA-YE de forma a conservar a viabilidade.

2.2 – Inóculos de *L. monocytogenes*

Com a ajuda de uma ansa retirou-se uma colónia de uma cultura em rampa, e ressuspendeu-se em tubo contendo 25 ml de TSB-YE (30 g/l de TSB e 6 g/l de extracto de levedura).

De forma a permitir que as células de *L. monocytogenes* atingissem a fase estacionária, visto ser nesta fase que esta bactéria apresenta maior resistência a factores de stresse (Davis *et al.*, 1996), incubou-se o inóculo durante 18 horas a 37 °C. As células foram depois recolhidas por centrifugação a 3000 g durante um período de 10 minutos e ressuspendidas em 3 ml de solução de Ringer (Biokar Diagnostics). Este procedimento foi aplicado imediatamente antes da realização dos ensaios de inactivação de cada isolado.

2.3 – Ensaio de inactivação com vinho

Para a realização deste trabalho utilizou-se um vinho tinto da região de origem controlada do Alentejo. Antes da realização de cada ensaio de inactivação esterilizou-se o vinho utilizando um filtro de celulose de 47 mm de diâmetro com porosidade de 0,45 µm (Pall Corporation, Michigan, EUA).

2.3.1 – Ensaio de inactivação com vinho diluído 1:100

Tendo como objectivo realizar ensaios de inactivação utilizando vinho diluído numa proporção de 1:100, 49,5 ml de solução Ringer foram adicionados a um frasco de 100 ml juntamente com 1 ml da suspensão celular obtida previamente, avaliando-se de seguida a concentração inicial de *L. monocytogenes* como descrito em 2.5. De seguida, transferiu-se a solução para um outro frasco de 100 ml ao qual havia sido, previamente, adicionado 500 µl de vinho esterilizado.

A partir do momento da transferência foi avaliada a densidade populacional de *L. monocytogenes* aos 20, 40, 60, 90, 120 e 180 segundos como descrito em 2.7.

A experiência realizou-se em banho-maria, a uma temperatura de 20 °C, e a garantia da homogeneidade da solução foi conseguida utilizando-se um agitador magnético.

O pH da solução final foi monitorizado antes da realização de cada ensaio, utilizando-se esse fim um eléctrodo (Crison Instruments, Barcelona, Espanha).

Visto os tempos de amostragem serem muito curtos não foi possível proceder às diluições e inoculações entre cada ponto de amostragem. Assim, a cada ponto de amostragem colocou-se 1 ml de amostra em 9 ml de solução de Ringer, tendo-se procedido às restantes diluições e subseqüentes inoculações apenas quando cada ensaio de inactivação estava terminado. Para garantir que durante este tempo de espera na diluição 10^{-1} não ocorreu inactivação celular realizou-se para cada isolado um controlo, durante 30 minutos, com 50 ml de Ringer, 50 μ l de vinho tinto e 1 ml da suspensão celular.

2.3.2 – Ensaio de inactivação com vinho diluído 1:10

Tendo como objectivo realizar ensaios de inactivação utilizando vinho diluído numa proporção de 1:10, 45 ml de solução Ringer foram adicionados a um frasco de 100 ml juntamente com 1 ml da suspensão celular obtida previamente, avaliando-se de seguida a concentração inicial de *L. monocytogenes*. De seguida, transferiu-se a solução para um outro frasco de 100 ml ao qual havia sido, previamente, adicionado 5 ml de vinho esterilizado.

A partir do momento da transferência foi avaliada a densidade populacional de *L. monocytogenes* aos 30, 60, 90, 120 e 180 segundos, como descrito em 2.7.

As condições experimentais e os controlos associados a cada isolado foram os mesmas referidas em 2.4.1., com a diferença que entre cada ponto de amostragem procedeu-se imediatamente à elaboração da diluição 10^{-1} e 10^{-2} para garantir a total inactivação do efeito antibacteriano do vinho

2.4 – Simulação do ambiente gástrico

No sentido de simular o ambiente gástrico procedeu-se à preparação de um fluido gástrico sintético. Para tal preparou-se uma solução com 1 g/l de pepsina (Sigma-

Aldrich, Steinheim, Alemanha) em água desionizada, tendo-se posteriormente acertado o pH da solução para 1,5 (Oemen *et al.*, 2003), recorrendo-se a uma solução 6 M de HCl. A solução do fluído gástrico sintético foi preparada antes de cada utilização.

Posteriormente colocou-se num Erlenmeyer de 100 ml, 21,5 g de matriz alimentar à qual se juntou 21,5 ml de fluído gástrico sintético e 7 ml de água ou de vinho. Um controlo com 21,5 g de matriz alimentar e 28,5 ml de água desionizada estéril foi igualmente realizado. Após montado o sistema para simulação do ambiente gástrico foi adicionado 1 ml da suspensão celular obtida em 2.2, no entanto, nesta experiência apenas foram utilizados os isolados 2807 e FSL-F7-01.

A densidade populacional de *L. monocytogenes* foi avaliada aos 2,5, 7,5, 20 e 60 minutos. A quantidade de vinho utilizada corresponde à proporção de um copo de vinho numa refeição (100-150 ml) (Carneiro *et al.*, 2007).

Foram testadas duas matrizes alimentares: um queijo fundido (El Caserio, Madrid, Espanha) e uma papa de maçã e pêra para bebés (Nestlé, Esplugues de Llobregat, Espanha). A esterilidade de ambas as matrizes foi avaliada transferindo 10g para TSA-YE, tendo-se incubado as placas a 37 °C durante 48 horas.

A garantia da homogeneidade da simulação do ambiente gástrico foi conseguida através do uso de um agitador magnético e a temperatura controlada num banho-maria a 37 °C.

2.5 – Simulação da Passagem Gastrointestinal

No sentido de realizar uma simulação da passagem gastrointestinal interveio-se sobre o sistema onde se realizou a simulação do ambiente gástrico. Assim sendo, reajustou-se o pH da solução para 7,8 (Oemen *et al.*, 2003), recorrendo-se a uma solução de NaOH 10 M, e adicionou-se sais biliares (Pronadisa, Madrid, Espanha) até perfazer uma concentração final de 1,5 g/l (Turnberg & Anthony-Mote, 1969). Adicionou-se igualmente 3 g/l de pancreatina (Sigma-Aldrich) (Oemen *et al.*, 2003).

A densidade populacional de *L. monocytogenes* foi avaliada aos 60, 120, 180 e 240 minutos.

A garantia da homogeneidade da simulação da passagem gastrointestinal foi conseguida através do uso de um agitador magnético e a temperatura controlada num banho-maria a 37 °C.

2.6 – Enumeração de *Listeria monocytogenes* e análise estatística

Em cada ponto de amostragem foram realizadas diluições decimais em tubos contendo 9 ml de solução de Ringer. A enumeração foi efectuada em TSA-YE, utilizando o método da gota (Miles & Misra, 1938), incubando-se as placas por 18 horas a 37 °C para todos os casos, excepto para os ensaios de inactivação com vinho diluído 1:10. Neste ultimo caso foi necessário recorrer-se a 36 horas de incubação a 37 °C.

Os ensaios para cada isolado foram todos realizados em duplicado, assim como as respectivas contagens, tendo os resultados sido apresentados em \log_{10} (ufc/ml).

Para se obter as representações gráficas recorreu-se ao *software* Microsoft Excel 2007. (Microsoft Corporation, Redmond, EUA).

Realizou-se uma análise de variância (one-way ANOVA) para verificar se a sobrevivência de *L. monocytogenes* (log ufc/ml) variou significativamente com (i) a concentração de vinho (ii) a origem dos isolados (clínica ou alimentar) e (iii) nos ensaios de simulação da passagem pelo tracto gastrointestinal, a matriz alimentar. Todos os cálculos foram realizados utilizando a versão 4.03 do *software* KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA, USA).

3 – Resultados

3.1 – Serotipagem dos isolados de *Listeria monocytogenes*

Segundo o método de Doumith *et al.* (2004), o serogrupo dos isolados de *L. monocytogenes* utilizados neste trabalho são os discriminados na tabela 3.1.

Tabela 3.4 – Informação referente aos serogrupos dos isolados utilizados neste trabalho

| Isolados clínicos | | Isolados alimentares | |
|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|
| Referência do isolado | Serogrupo | Referência do isolado | Serogrupo |
| 2541 | IVb | FSL-F7-88 | IIc |
| 2693 | IIb | FSL-F7-20 | IIa |
| 2649 | IIb | FSL-F7-01 | IIc |
| 2792 | IVb | 2589 | IVb |
| 2793 | IVb | 2619 | IIc |
| 2797 | IVb | 2653 | IIa |
| 2798 | IVb | 2796 | IIc |
| 2807 | IVb | 2801 | IIa |

Verificou-se que o serogrupo predominante nos isolados clínicos foi o IVb, existindo ainda uma pequena representação do serogrupo IIb. Por outro lado, os isolados alimentares apresentaram uma maior diversidade de serogrupos.

3.2 – Curvas de inativação em solução com vinho diluído 1:100

No sentido de conseguir monitorizar e discriminar o comportamento de 16 isolados de *L. monocytogenes* na presença vinho tinto, realizaram-se curvas de inativação em vinho diluído 1:100 em solução de Ringer. Foram previamente realizados ensaios com vinho não diluído e com vinho diluído 1:4 e 1:8 que mostraram um efeito de inativação muito forte, rapidamente se atingindo (ao fim de poucos segundos) densidades de células viáveis abaixo do limite de detecção, (dados não apresentados).

Após realização das curvas de inativação com 1% de vinho, referentes aos isolados de origem clínica obtiveram-se os resultados ilustrados na figura 3.1

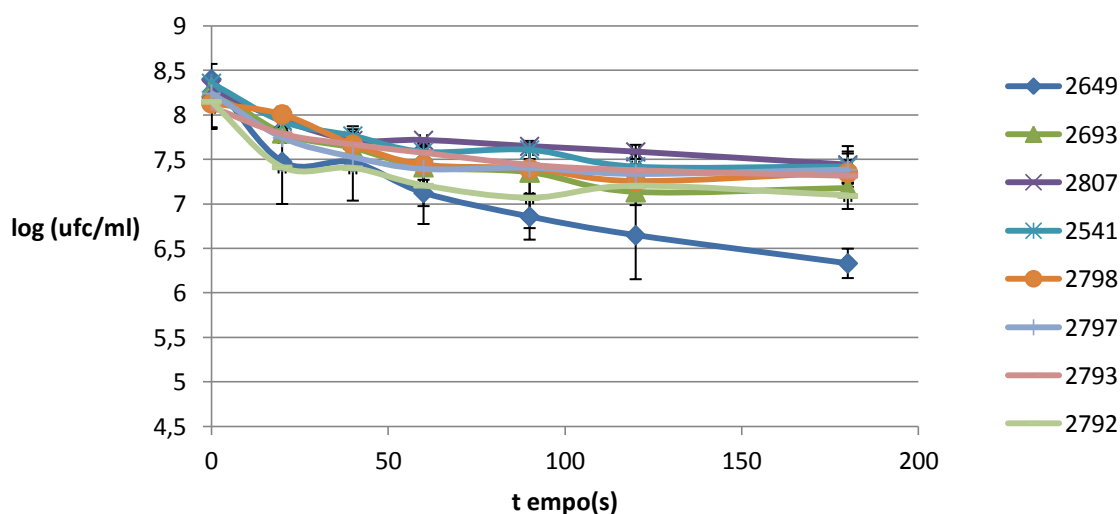


Figura 3.1 – Curvas de inativação dos diferentes isolados clínicos em solução contendo vinho diluído 1:100

O pH correspondente a esta solução (vinho diluído 100 vezes em solução de Ringer) foi de $3,9 \pm 0,2$.

Apesar da baixa concentração de vinho utilizada houve um isolado – o isolado 2649 – que em apenas 3 minutos viu a sua concentração diminuir dois ciclos logarítmicos. Este isolado pertence ao serogrupo IIb. A grande maioria dos isolados de origem clínica sofreu uma inativação inferior a 2 ciclos logarítmicos nos 3 min do ensaio.

Os resultados, na forma de curvas de inativação, dos isolados de origem alimentar, nas mesmas condições acima descritas, são significativamente ($p < 0,05$) diferentes dos isolados clínicos (fig. 3.2).

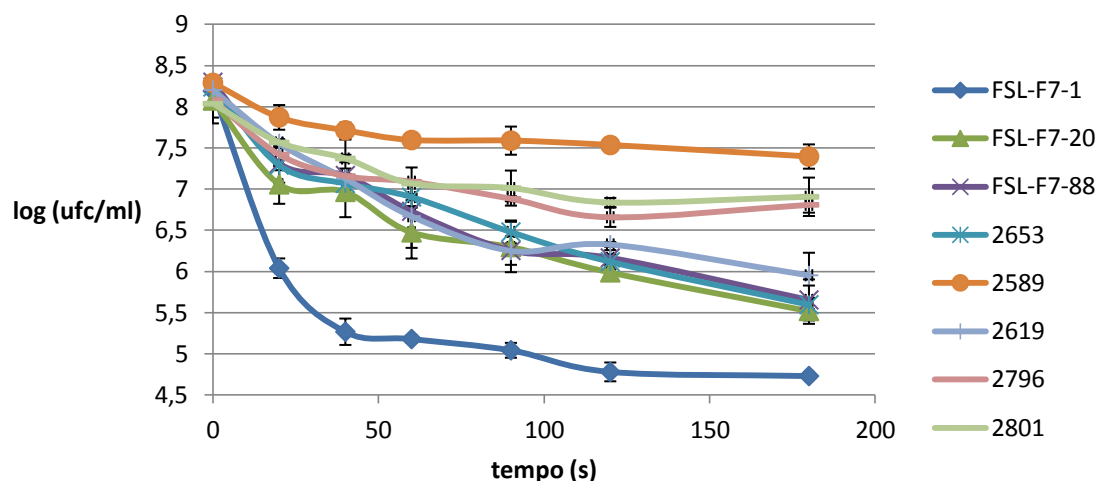


Figura 3.2 – Curvas de inativação dos diferentes isolados alimentares vinho diluído na proporção 1:100

Neste caso observou-se uma maior diversidade de respostas, ou seja, enquanto o isolado 2589 sofreu uma quase imperceptível redução aconteceu o contrário com os isolados FSL-F20, FSL-F7-88 e 2653. Estes isolados, na presença de vinho diluído 1:100 sofreram uma redução de aproximadamente dois ciclos logarítmicos em 3 minutos. Este efeito foi ainda superior no isolado FSL-F7-01, visto neste caso ter sido observada uma redução superior a três ciclos logarítmicos. O isolado mais resistente dentro dos isolados de origem alimentar foi o único isolado do serogrupo IVb. Este isolado teve um comportamento semelhante aos isolados do mesmo serogrupo mas com origem clínica.

Assim, foi detectada uma diferença na extensão da inativação entre os isolados clínicos e os isolados alimentares ($p < 0,05$), diferença essa que se traduz numa maior sensibilidade ao vinho dos isolados de origem alimentar em comparação com os isolados de origem clínica.

3.3 – Curvas de inativação em solução com vinho diluído 1:10

Tendo como intenção discriminar de forma mais eficaz os diferentes isolados, diminui-se a diluição do vinho para 1:10, e testou-se a resistência dos três isolados mais

resistentes com vinho diluído a 1:100 dos grupos de origem alimentar e de origem clínica.

O pH correspondente a esta solução (90% solução de Ringer e 10% de vinho) foi de $3,3 \pm 0,2$.

A figura 3.3 mostra as curvas de inactivação referentes aos isolados de origem clínica efectuadas com vinho diluído na proporção de 1:10.

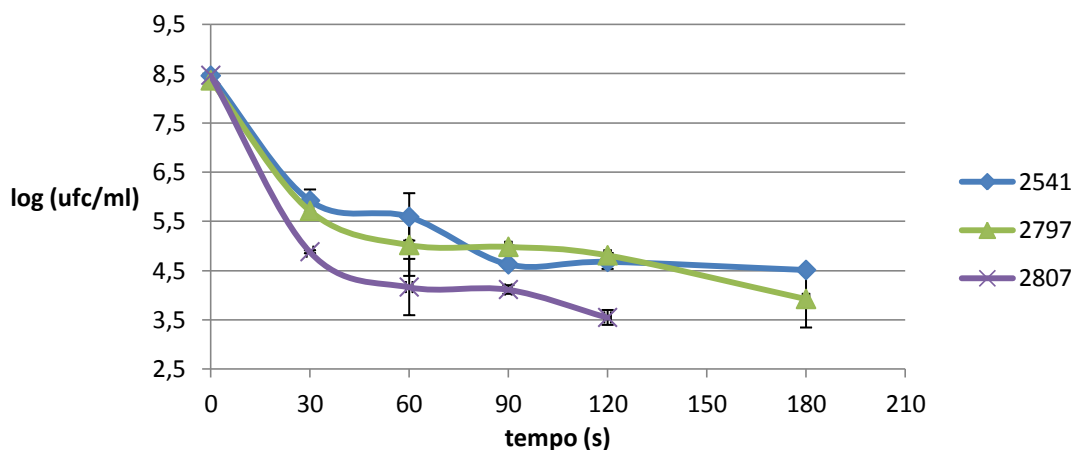


Figura 3.3 – Curvas de inactivação dos diferentes isolados clínicos com vinho diluído na proporção 1:10

Observou-se, neste caso, uma maior redução da concentração de células viáveis de *L. monocytogenes* em comparação com as curvas de inactivação realizadas com vinho diluído 1:100, tendo-se atingindo uma diminuição de cerca de quatro ciclos logarítmicos em 3 minutos para o caso dos isolados 2541 e 2797, e valores abaixo do limite de detecção (<500 UFC/ml) para o isolado 2807 após 2 minutos. Todos estes isolados pertencem ao serogrupo IVb.

A figura 3.4 mostra as curvas de inactivação referentes aos isolados de origem alimentar efectuadas em solução com vinho diluído 1:10

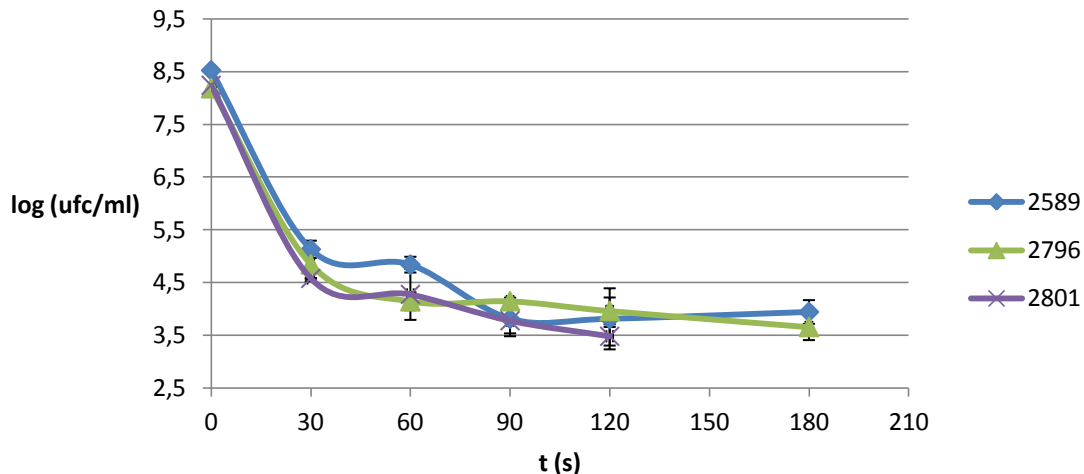


Figura 3.4 – Curvas de inativação dos diferentes isolados alimentares vinho diluído na proporção 1:10

Neste caso observaram-se resultados semelhantes aos obtidos para os isolados clínicos. Observaram-se, assim, reduções na ordem dos quatro ciclos logarítmicos na concentração de células viáveis de *L. monocytogenes* em 3 minutos, tendo, o isolado 2801 atingido uma concentração inferior ao limite de detecção da técnica utilizada após 2 minutos, o que traduz uma redução de pelo menos cinco ciclos logarítmicos na sua concentração neste espaço de tempo.

Os serogrupos dos isolados alimentares utilizados nas curvas de inativação em vinho 1:10 apresentaram uma maior diversidade que os isolados de origem clínica sendo esses serogrupos os seguintes: 2589 – IVb; 2796 – IIc e 2801 – IIa. O serogrupo IVb apresentou-se, uma vez mais, como o mais resistente às condições de stresse impostas pelo vinho tinto.

Apesar da diversidade de serogrupos testados em vinho 1:10 não foram detectadas diferenças significativas ($p > 0.05$) entre a inativação de células de *L. monocytogenes* de origem clínica e alimentar.

Nos controlos realizados paralelamente não foi observada redução na concentração de células viáveis de *L. monocytogenes* para nenhum dos 16 isolados testados (dados não apresentados).

3.4 – Simulação do ambiente gastrointestinal

No sentido de avaliar o efeito do vinho nos diferentes isolados de *L. monocytogenes* em contexto de refeição, procedeu-se à elaboração de um modelo digestivo simulado. Para perceber a influência da matriz alimentar na resistência das

células de *L. monocytogenes* num modelo gastrointestinal simulado, foram escolhidas duas matrizes alimentares diferentes: um queijo fundido – com alto teor proteico e lipídico – e uma papa de polpa de frutas (maçã e pêra) – com alto teor de hidratos de carbono.

Foram seleccionados para estes ensaios um isolado clínico resistente às condições testadas anteriormente e um isolado alimentar sensível às mesmas.

3.4.1 – Simulação do ambiente gastrointestinal utilizando queijo como matriz alimentar

Após simulação da passagem pelo tracto gastrointestinal, utilizando-se como matriz alimentar um queijo fundido, obtiveram-se, para o isolado 2807, de origem clínica, os resultados apresentados na figura 3.5.

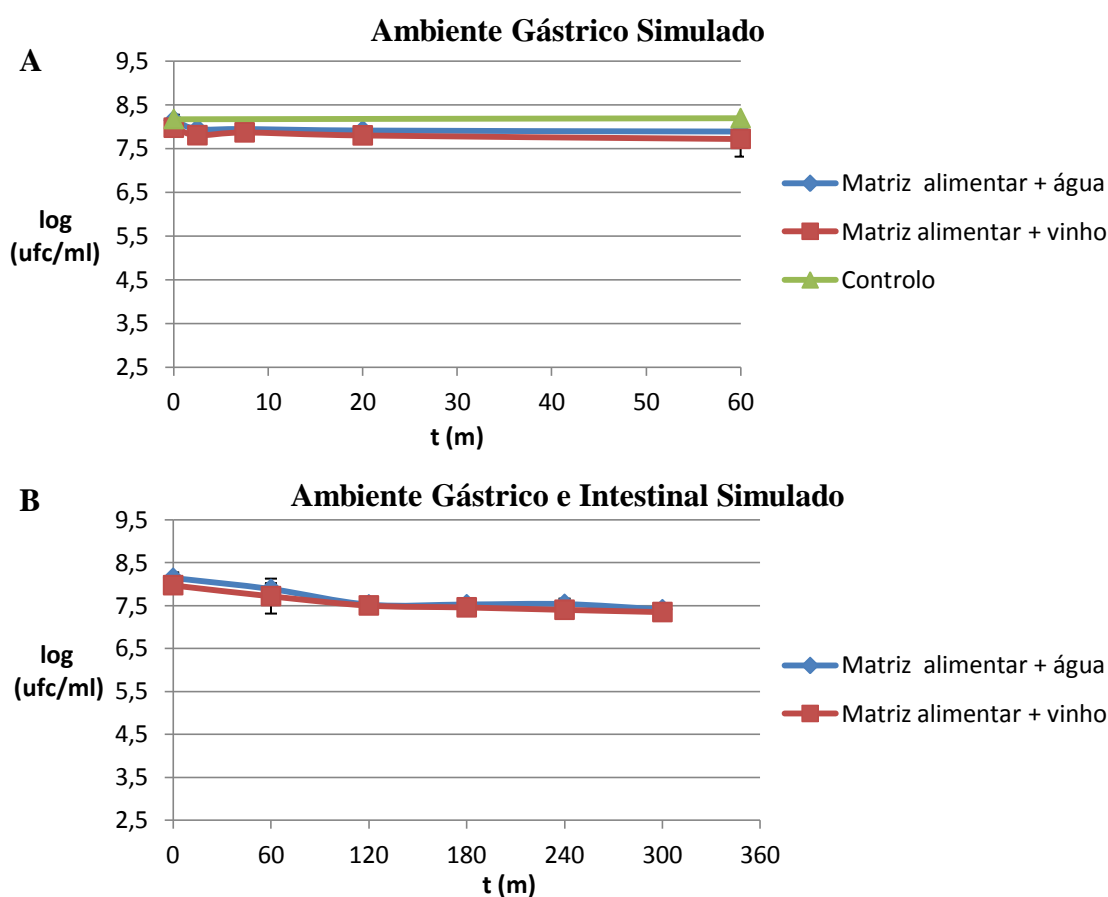


Figura 3.5 – Curvas de inactivação do isolado 2807, de origem clínica, em ambiente gástrico simulado (A), e ambiente gastrointestinal simulado (B) com uma matriz alimentar de queijo fundido

O pH correspondente ao ambiente gástrico simulado com uma matriz alimentar de queijo fundido foi de 6,2, quando se adicionou água, e de 5,8 quando se adicionou vinho.

Observou-se, assim, que nas condições testadas, *L. monocytogenes* praticamente não foi inactivada no ambiente gastrointestinal simulado, tanto na sua componente gástrica como na sua componente intestinal. A mesma observação foi efectuada quando foi adicionada uma quantidade equivalente a um copo de vinho por refeição ao ambiente gastrointestinal simulado,.

Após simulação gastrointestinal, utilizando-se como matriz alimentar um queijo fundido, obtiveram-se, para o isolado alimentar FSL-F7-01, os resultados apresentados na figura 3.6.

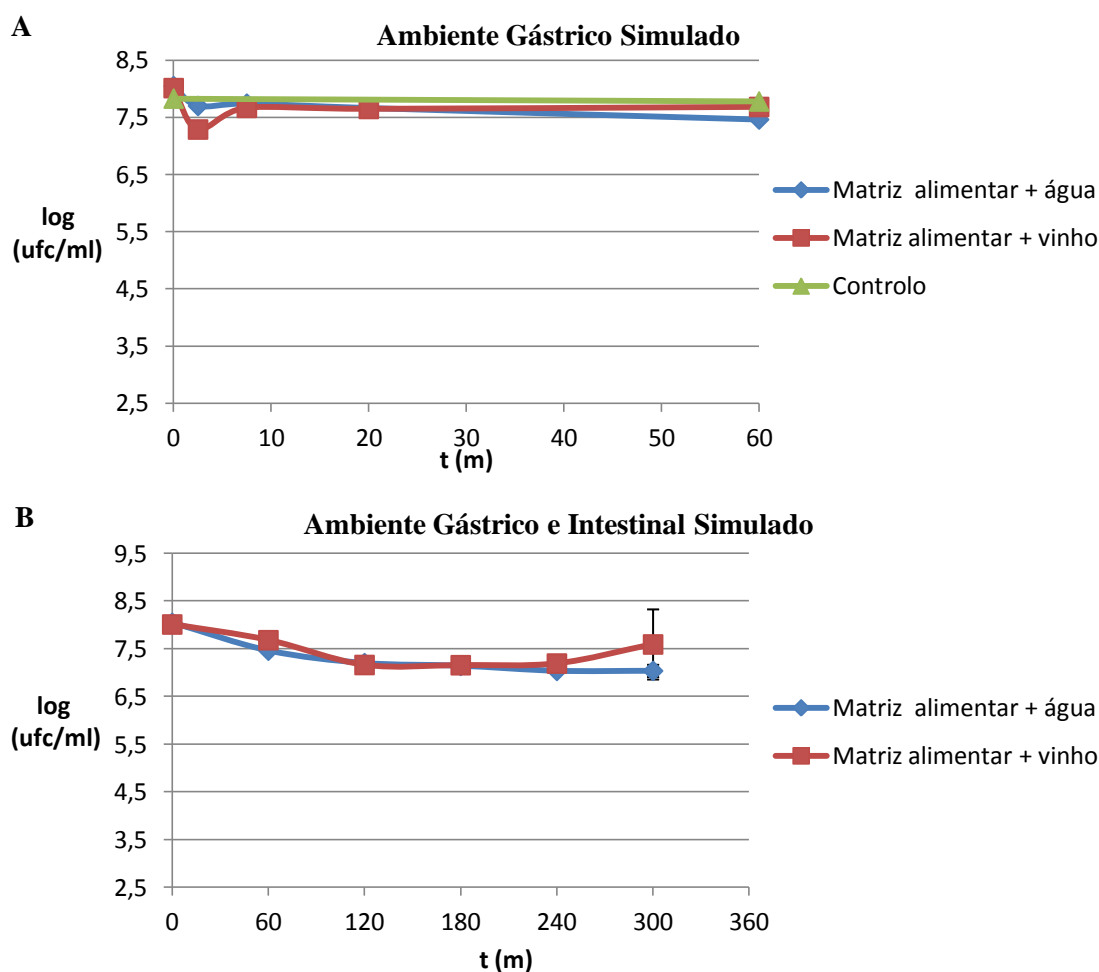


Figura 3.6 – Curvas de inactivação do isolado FSL-F7-01, de origem alimentar, em ambiente gástrico simulado (A), e ambiente gastrointestinal simulado (B) com uma matriz alimentar de queijo fundido

Tal como havia sido observado para o isolado 2807, observou-se uma ligeira inactivação (< 1 ciclo logarítmico) no ambiente gastrointestinal simulado, tanto na sua componente gástrica como na sua componente intestinal,. A mesma observação foi efectuada quando adicionada a quantidade correspondente a um copo de vinho por refeição, não se observando diferenças comportamentais por parte deste isolado na presença ou ausência de vinho, quando a matriz alimentar é um queijo fundido. Com efeito, nesta matriz alimentar, não se observou efeito antibacteriano relevante por parte do ambiente gastrointestinal sintético para ambos isolados, com ou sem adição de vinho.

3.4.2 – Simulação do ambiente gastrointestinal com uma matriz de polpa de fruta

O pH correspondente ao ambiente gástrico simulado com uma matriz alimentar de polpa de fruta foi de 3,2 quando se adicionou água e de 3,1 quando se adicionou vinho.

Após simulação gastrointestinal, utilizando-se como matriz alimentar uma papa de polpa de maçã e pêra, obtiveram-se, para o isolado 2807, de origem clínica, os resultados apresentados na figura 3.7.

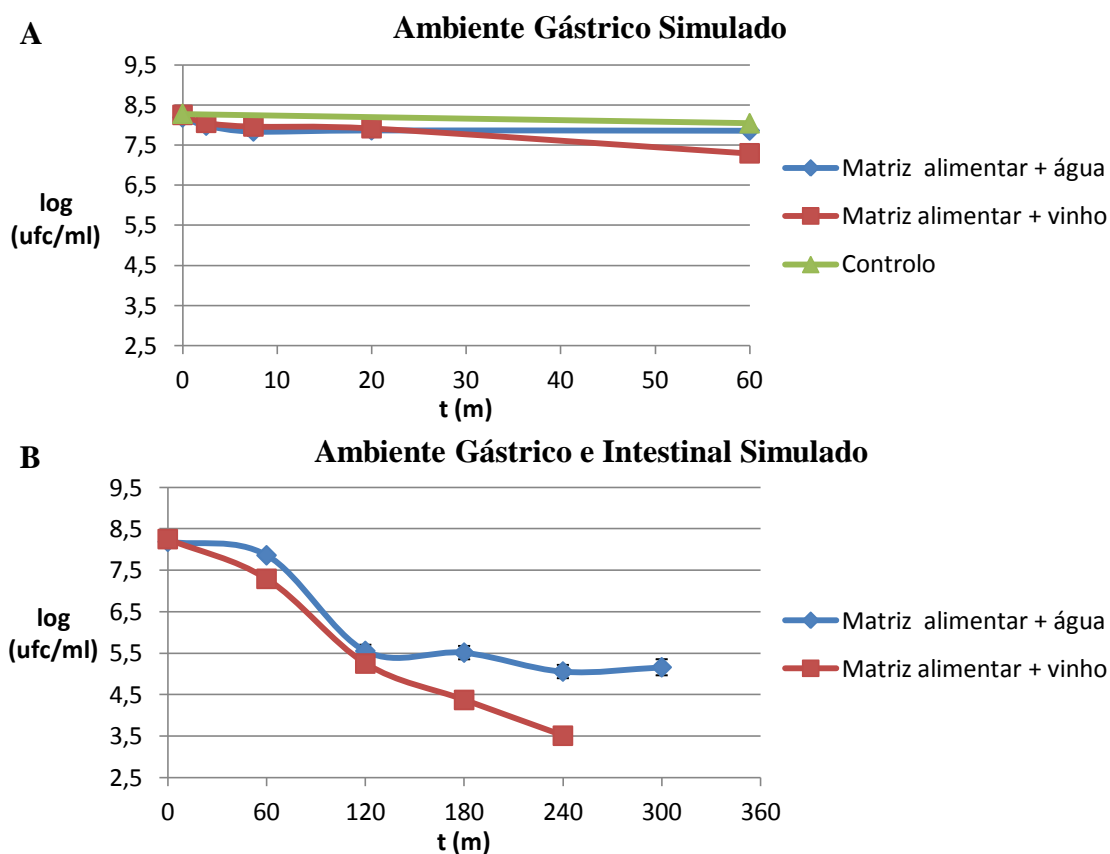


Figura 3.7 – Curvas de inactivação do isolado 2807, de origem clínica, em ambiente gástrico simulado (A), e ambiente gastrointestinal simulado (B) com uma matriz alimentar de polpa de fruta

Por contraposição com os resultados obtidos com uma matriz de queijo, os resultados obtidos com uma matriz de fruta (uma papa de maçã e pêra) mostram uma redução da concentração de células viáveis de *L. monocytogenes*, mais significativa na presença de vinho tinto. Essa redução foi claramente mais pronunciada quando nas condições que simularam a passagem intestinal.

Com efeito, a partir das 4 horas em ambiente intestinal simulado, a concentração de *L. monocytogenes* atingiu o limite de detecção da técnica utilizada quando se adicionou vinho tinto. Não obstante, mesmo na ausência de vinho, ao contrário do reportado para uma matriz alimentar de queijo fundido, registou-se uma redução na concentração deste isolado de aproximadamente três ciclos logarítmicos.

Os resultados obtidos, nas mesmas condições previamente descritas, para o isolado FSL-F7-07, de origem alimentar, estão representados na figura 3.8.

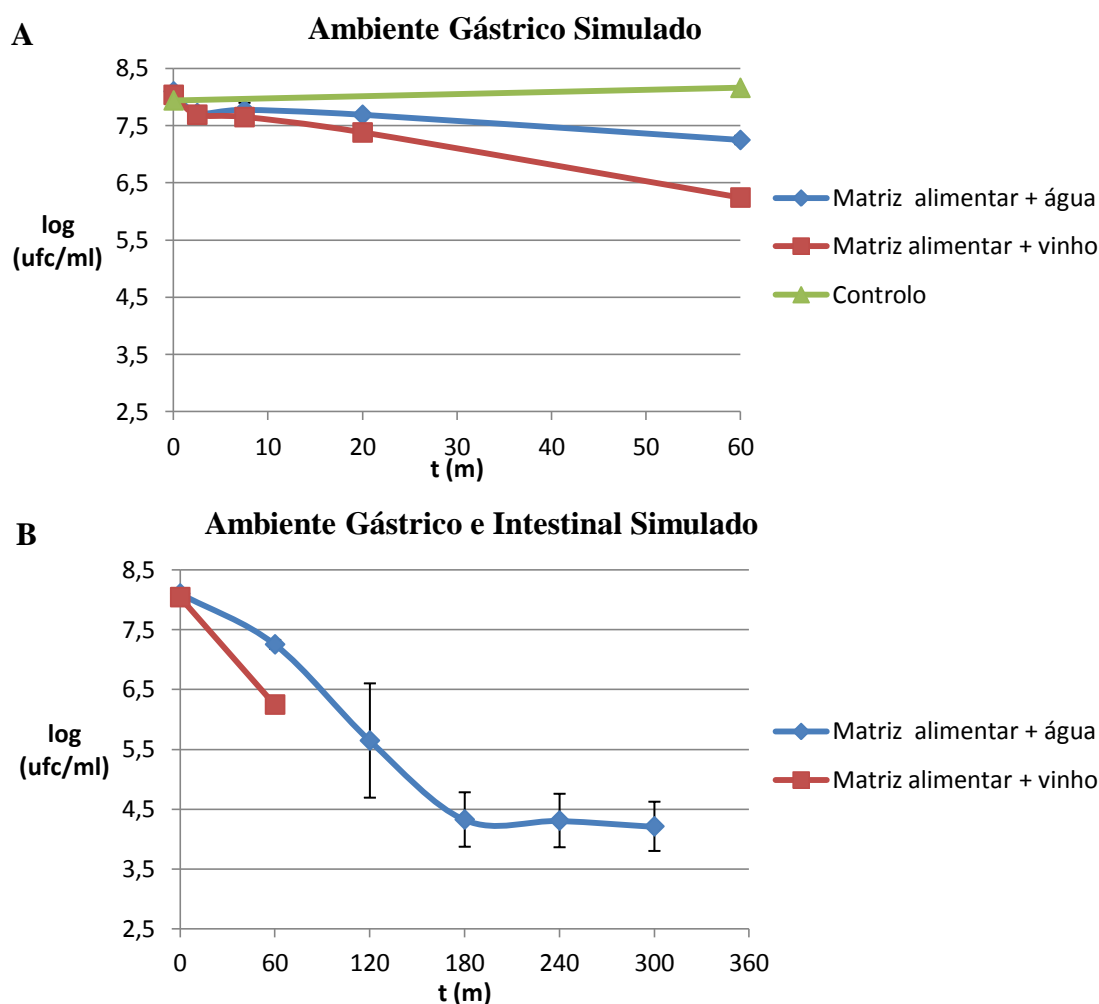


Figura 3.8 – Curvas de inativação do isolado FSL-F7-01, de origem alimentar, em ambiente gástrico simulado (A), e ambiente gastrointestinal simulado (B) com uma matriz alimentar de polpa de fruta

A simulação do ambiente gastrointestinal com uma matriz de polpa de fruta, utilizando um isolado de origem alimentar, apresentou resultados substancialmente diferentes ($p < 0.05$) dos do isolado de origem clínica.

Se por um lado a redução da concentração de células viáveis de *L. monocytogenes* na ausência de vinho foi de aproximadamente quatro ciclos logarítmicos – em contraposição com os três ciclos logarítmicos obtidos quando testadas as mesmas condições com o isolado clínico, por outro, apenas uma hora após a mudança das condições gástricas para as condições intestinais, na presença de vinho, já não foi possível obter contagens de células de *L. monocytogenes* (<500 UFC/ml)

Fica assim evidenciado, em ambiente gastrointestinal simulado, o efeito do vinho e diferenças entre isolados, quando a matriz alimentar é uma polpa de fruta ao invés de ser um queijo fundido.

4 – Discussão

4.1 – Efeito bactericida do vinho sobre *Listeria monocytogenes*

Foi observado neste trabalho uma grande sensibilidade de *L. monocytogenes* ao vinho. Com efeito, mesmo os isolados mais resistentes expressaram uma redução na ordem dos quatro ciclos logarítmicos em apenas 3 minutos na presença de vinho tinto diluído 10 vezes em solução de Ringer. Efectivamente, está reportado que células *L. monocytogenes* são bastantes sensíveis às condições que o vinho tinto lhes impõe (Rhodes *et al.*, 2006; Friedman *et al.*, 2007).

Está reportado que a partir de valores de pH incomportáveis com o crescimento de células de *L. monocytogenes* ocorre a inactivação das mesmas (Cole *et al.*, 1990). O pH mínimo que permite a sobrevivência de *L. monocytogenes* ao fim de quatro semanas é 4,66 a 30°C e 4,19 a 5°C (Cole *et al.*, 2008) um valor substancialmente mais alto que o detectado na solução com 10% de vinho (3,3±0,2). Efectivamente, contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7, o pH foi a característica do vinho tinto que mais activamente contribuiu para a inactivação destas bactérias (Waite & Daeschel, 2007).

Contudo, para o caso de *L. monocytogenes*, é expectável que outros compostos contribuam activamente para a inactivação. Efectivamente está reportada a capacidade antilisteria apresentada pelo vinho tinto, fruto dos diversos compostos antibacterianos que esta bebida possui, p.ex: a presença de compostos fenólicos (Vaquero *et al.*, 2006) e a presença de etanol (Corral *et al.*, 1990).

A capacidade antilisteria foi revelada quando utilizado vinho tinto na elaboração de marinadas: com vinho tinto, folhas de orégão, extracto de alho e 0,05% de óleo de orégãos, conseguiu-se, instantaneamente, uma redução para níveis indetectáveis de uma suspensão de *L. monocytogenes* com concentração inicial de 10⁵ cfu/ml, (Friedman *et al.*, 2007).

Os polifenóis poliméricos derivados das sementes e das cascas das uvas tintas estão identificados como possuidores de capacidade antilisteria (Rhodes *et al.*, 2006). Baydar *et al.* (2003) demonstraram que extractos fenólicos da semente de uvas, a uma concentração de 20%, possuem actividade inibitória sobre *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,

Mycobacterium smegmatis, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, mas muito especialmente sobre *L. monocytogenes*.

Os ácidos caféico, rutina e quercetina estão identificados como tendo uma forte capacidade antilisteria (Vaquero *et al.*, 2006), assim como os ácidos fenólicos, cinâmico, ferúlico e cumárico; actividade essa superior a um pH de 4,5 do que a pH de 5,5 ou de 6,5. Isto sugere que o pH aumenta a capacidade antilisteria dos ácidos fenólicos presentes no vinho tinto (Delaquis *et al.*, 2002).

Uma solução com 5% de etanol apresenta uma forte capacidade inibitória de *L. monocytogenes* (Corral *et al.*, 1990). Nas concentrações expectáveis para um vinho tinto, o etanol apresenta um maior efeito antilisteria do que uma mistura de ácidos orgânicos (ácido málico, láctico e tartárico), no entanto a actividade de ambos é aumentada quando os ácidos orgânicos estão presente conjuntamente com o etanol (Fernandes *et al.*, 2006)

Como já havia sido referido anteriormente (1.5) a actividade antibacteriana de soluções complexas como o vinho não pode ser exclusivamente atribuídas aos seus componentes fenólicos ou não fenólicos, nem pode essa mesma actividade ser prevista com base na análise quantitativa dos compostos individuais (Boban *et al.*, 2010) sendo por isso, necessário considerar o vinho como um todo em que os diferentes compostos antibacterianos interactuam.

4.2 – Diferenças entre isolados clínicos e alimentares na capacidade de resistência a condições adversas

Como foi demonstrado, na presença de 10% de vinho tinto não foram detectadas diferenças significativas entre os três isolados mais resistentes ($p > 0,05$), tanto alimentares como clínicos (resistência testada primeiramente com 1% de vinho). Tal aconteceu apesar da heterogeneidade dos serogrupos dos isolados alimentares – IVb; IIa e IIc. Como já foi exposto em 4.1, *L. monocytogenes* apresenta uma forte sensibilidade ao vinho tinto. Assim, uma concentração de 10% de vinho foi provavelmente demasiado alta para observar diferenças na resistência ao vinho tinto entre isolados de diferentes serogrupos e origens. No entanto, os isolados de origem alimentar revelaram-se significativamente ($p < 0,05$) mais sensíveis que os isolados de origem clínica quando confrontados com 1% de vinho tinto.

Juntamente com o serótipo, o estado imunitário do hospedeiro e o nível de contaminação do produto, a virulência da estirpe representa um papel importante na capacidade de desenvolver listeriose (Werbrouck *et al*, 2009), a qual se apresenta como multifactorial, não esquecendo ainda a capacidade de resistência às condições de stresse impostas pelo sistema gastrointestinal. Efectivamente, quando injectadas células desta bactéria directamente na corrente sanguínea de cobaias não foram detectadas diferenças de patogenicidade entre 63 isolados alimentares e 62 clínicos (Brosch *et al.*, 1993). Corral *et al.* (1990) observaram que tanto isolados clínicos como alimentares eram hemolíticos, invasivos e citotóxicos quando infectavam ratos imunocomprometidos, não havendo diferenças significativas na patogenicidade dos isolados. No entanto, 90% dos casos de listeriose humana ocorrem devido à infecção apenas por parte dos serótipos 4b, 1/2a e 1/2b (Ramaswamy *et al.*, 2007). Daí a importância da resistência às condições gastroalimentares na diferenciação da patogenicidade entre estes serótipos e os restantes (Werbrouck *et al*, 2009).

É expectável encontrar diferentes reacções perante condições de stresse por parte de diferentes serótipos de *L. monocytogenes*. Com efeito, o serótipo 1/2a tende a ser mais resistente perante algumas bacteriocinas antilisteria que o serótipo 4b, no entanto este ultimo serótipo tende a ser mais resistente a altas temperaturas que o serótipo 1/2a (Buncic *et al*, 2000).

Foram encontradas diferenças na capacidade de resistência ao fluido gástrico por parte de diferentes isolados do serótipo 4b, diferenças essas não relacionados com a origem (Delaquis *et al.*, 2002). No entanto, foram reportadas diferenças na taxa de morte de isolados clínicos e alimentares do serótipo 4b perante condições ácidas, tendo os isolados clínicos apresentado uma menor taxa de morte (Just & Daeschel, 2003). Num estudo comparativo de resposta ao stresse ácido entre isolados clínicos e alimentares detectou-se que os isolados clínicos, em fase de crescimento exponencial, apresentavam uma maior resistência que os isolados alimentares (Vialette *et al*, 2002). O mesmo foi observado no presente trabalho.

Ramalheira *et al.* (2010) observaram que a sobrevivência no tracto gastrointestinal de células de *L. monocytogenes* dependia da origem do isolado e da estirpe, apresentando-se os isolados clínicos como mais resistentes que os alimentares. Com efeito, estirpes clínicas desta bactéria parecem ser mais resistentes aos efeitos desfavoráveis impostas por temperaturas de armazenamento (4°C) que estirpes alimentares, nomeadamente no que diz respeito à conservação das características de

virulência e a uma diminuição da duração da fase lag (Avery & Buncic, 1997). Está reportado igualmente que existe uma tendência por parte de isolados clínicos no sentido de apresentarem uma maior resistência ao stresse osmótico e a baixo pH que isolados alimentares (Dykes & Moorhead, 2000). Essa capacidade de resistir a condições ácidas pode ter efeitos importantes na expressão de genes relacionados com a virulência de *L. monocytogenes* (Werbrouck *et al.*, 2009).

A sobrevivência em condições adversas resulta em parte da activação de um factor sigma alternativo, σ^B , que está relacionado com a sobrevivência a baixas temperaturas, pressão osmótica (Becker *et al.*, 1998) e a condições ácidas (Wiedmann *et al.*, 1998). No entanto, a importância deste factor na resistência a condições adversas varia entre serótipos, tendo sido observado que era mais significativa a sua intervenção na adaptação a condições de stresse por parte do serótipo 1/2a (com origem clínica) que no serótipo 4c (com origem alimentar) (Moorhead & Dykes, 2003).

Assim, está sugerido que a capacidade de *L. monocytogenes* para resistir a condições adversas apresenta efectivamente um papel importante para diferenciar estirpes patogénicas de não patogénicas (Kazmierczak *et al.*, 2003; Moorhead & Dykes, 2003; Wonderling *et al.*, 2004)

4.3 – Ambiente gastrointestinal simulado

Apesar de *L. monocytogenes* apresentar uma grande sensibilidade ao vinho tinto, tal não foi observado quando simulado o ambiente gastrointestinal, com um queijo fundido como matriz. Apesar da presença de sais biliares e de uma concentração de 14% de vinho não ocorreu inactivação significativa de nenhum dos isolados, durante as 5 horas da simulação gastrointestinal.

Por outro lado, quando a matriz alimentar foi uma papa de fruta ocorreu, sem adição de vinho, uma redução significativa de células de *L. monocytogenes*. Redução essa que foi mais significativa para o isolado alimentar que para o isolado clínico ($p < 0,05$). A adição de vinho provocou uma redução adicional. Três horas após mudança para ambiente intestinal simulado não foram detectadas células viáveis do isolado clínico, enquanto que bastou 1 hora para não se detectar células viáveis do isolado alimentar. Quando a matriz alimentar era uma papa de fruta o comportamento de ambos os isolados foi significativamente diferente em todas as situações ($p < 0,05$). Estes

resultados contrastam com a resistência demonstrada, por ambos os isolados com ou sem adição de vinho, quando a matriz era um queijo fundido ($p > 0,05$).

Para tal, pode ter contribuído o aumento do pH induzido pela matriz alimentar quando esta foi um queijo fundido, pois apesar do pH do fluído gástrico sintético ser de 1,5, o pH da simulação do ambiente gástrico foi elevado quando adição da matriz alimentar – 6,2 sem vinho e 5,8 com vinho. Garner *et al.*, (2006), sugerem que as características das estirpes patogénicas de *L. monocytogenes* que influenciam as respectivas doses infecciosas estão relacionadas com propriedades específicas dos alimentos que serviram como vectores para a infecção (p.ex. pH, presença de sais ou de ácidos orgânicos). Efectivamente, os valores de pH observados com queijo fundido eram mais elevados do que quando a matriz era uma papa de pêra e maçã (neste caso, 3,2 sem adição de vinho e 3,1 com adição de vinho).

A importância do pH na capacidade antibacteriana do fluido gástrico é unanimemente reconhecida há vários anos (Giannella *et al.*, 1972; Martinsen *et al.*, 2005). Um fluído gástrico com pH entre 1 e 2 é activo contra a maior parte dos microrganismos patogénicos, contudo a neutralização desse pH por meios de utilização de fármacos pode aumentar o risco desenvolvimento de patologias devido a ingestão de alimentos contaminados com organismos patogénicos (Smith, 2003). O mesmo subentende-se em relação ao aumento do pH do ambiente gastrointestinal devido à ingestão de alimentos.

Após mudança das condições gástricas para condições intestinais, na ausência de vinho, o isolado clínico sofreu uma inactivação de 2,5 ciclos logarítmicos em apenas uma hora e o isolado alimentar sofreu, por sua vez, uma redução de 3,5 ciclos logarítmicos em 2 horas. Findados estes períodos os isolados mantiveram a concentração de células viáveis.

Barmpalia-Davis *et al.*, (2008), sugerem que, apesar da capacidade de *L. monocytogenes* resistir às condições ácidas da passagem gastrointestinal é crucial que todas as suposições em relação à sobrevivência no trato gastrointestinal tomem em consideração outros factores relacionados com todo o processo digestivo, como a presença de matriz alimentar. Com efeito, está reportado que estirpes de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, e *Streptococcus thermophilus* apresentam maior resistência ao stresse imposto pelo processo digestivo quando está presente leite. (Conway *et al.*, 1986).

Esta diferença de pH explica em parte as diferenças observadas entre as matrizes alimentares, no entanto outros factores terão contribuído. Gardiner *et al.*, (1998), sugere que, para além do aumento do pH induzido sobre o ambiente gástrico, um queijo Cheddar protege efectivamente *Enterococcus faecium* devido ao seu alto teor em lípidos e densidade da matriz. Com efeito, a matriz de queijo apresenta um conteúdo lipídico mais elevado do que a papa de fruta.

A microencapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* e de *Bifidobacterium longum* em matrizes lipídicas confere resistência a estas bactérias perante as condições gástricas (Picot & Lacroix, 2003; Pimentel-González *et al.*, 2008). Com efeito, a difusão de H⁺, ácidos orgânicos, água e oxigénio é limitada quando as bactérias se encontram encapsuladas em partículas lipídicas (Pimentel-González *et al.*, 2008).

Olier *et al.*, (2004), observaram que dentro de um conjunto de isolados, com origem alimentar e clínica, todos conseguiram crescer, sem se ter detectado diferenças relacionadas com a origem, na presença de sais biliares incorporados em meio BHI – agar, mesmo quando a concentração dos sais biliares foi elevada para 2% - a concentração utilizada neste trabalho foi de 0,15%. Com efeito, a presença do gene *bsh* em isolados de *L. monocytogenes* vai levar à produção de uma hidrolase com actividade contra os sais biliares, capacidade essa que vai desempenhar um papel importante na colonização do tracto gastrointestinal (Dussurget *et al.*, 2002).

No entanto, Barbosa *et al.*, (2011), reportaram que, no espaço de uma hora, uma concentração de 0,3% de sais biliares era completamente efectiva contra seis isolados de origem alimentar. O mesmo efeito foi observado em quatro isolados de variadas origens na presença de uma concentração de 0,3% de sais biliares (King, *et al.*, 2002). No entanto, este último estudo refere, citando Sung *et al.* (1993), que deve ser notado que *in vivo* a capacidade antibacteriana dos sais biliares deverá ser muito mais baixa do que o observado *in vitro*. Isto porque a actividade antimicrobiana dos sais biliares existe em função das características hidrofóbicas das moléculas, sendo que as componentes hidrofóbicas são mais citotóxicas que as componentes hidrofílicas. Assim, e como a maior parte dos sais biliares estão complexados com fosfolípidos – logo, indisponibilizando as componentes hidrofóbicas dos sais biliares – as propriedades antimicrobianas destes sais são atenuadas *in vivo* (King, *et al.*, 2002). Daqui se pode também entender o porquê de uma matriz alimentar com alto teor lipídico ser mais efectiva na protecção das células de *L. monocytogenes*.

Peterson, *et al.*, (1989) observaram que a sobrevivência bacteriana em ambiente gástrico era reduzida quando ingeridas bebidas alcoólicas (incluindo vinho) sem uma matriz alimentar. Com efeito neste trabalho foi observado uma maior redução de ambos os isolados quando adicionado vinho ao ambiente gastrointestinal simulado, tendo o isolado alimentar sofrido uma redução significativamente maior ($p < 0,05$). O mesmo efeito foi observado por Fernandes *et al.*, (2006), sobre *Listeria innocua*.

Se por um lado é possível sugerir-se que a co-ingestão de vinho às refeições pode levar à redução da possibilidade de infecção por *L. monocytogenes*, por outro essa sugestão deve ser feita cautelosamente. Com efeito, quando a matriz alimentar continha uma forte componente lipídica e proteica não foi observado qualquer inativação por parte de ambos isolados, com ou sem vinho (pelo menos com a quantidade utilizada nestes ensaios).

Com efeito, se por um lado uma solução de vinho tinto pode reduzir seis ciclos logarítmicos as contagens de *S. enteritidis* e *E. coli* em 30 minutos, por outro, esse mesmo vinho quando co-ingerido por ratos numa refeição não conduziu a uma redução na infecção pelos mesmos microrganismos (Konishi *et al.*, 2001)

Os sistemas *in vitro* apresentam limitações visto muitos factores influenciarem a digestão humana. Por exemplo, um modelo *in vitro* não consegue avaliar os movimentos peristálticos, a resposta imune, a produção de muco ou o efeito competitivo da microflora. Mais ainda, o ambiente gástrico não assume um comportamento linear, visto responder a vários estímulos, como estímulos visuais, olfactivos e o sabor do alimento (Just & Daeschel, 2003). Outra limitação do modelo *in vitro* utilizado foi não se tratar de um modelo dinâmico, não tendo sido consideradas alterações ao longo do tempo das condições digestivas - p.ex. o pH ao longo do tempo baixa e a secreção de enzimas mantêm-se (Krull *et al.*, 2000). O volume e o tipo de alimento ingerido – como foi observado – também vão influenciar um processo *in vivo* de digestão (Just & Daeschel, 2003).

5 - Conclusão

Deste trabalho percebe-se a grande sensibilidade que *L. monocytogenes* apresenta perante o vinho tinto, parecendo essa sensibilidade ser dependente da sua origem. Efectivamente, os oito isolados alimentares testados neste trabalho foram mais sensíveis a uma baixa concentração de vinho que os oito isolados de origem clínica. Quando a concentração foi de 10% apenas ficou demonstrada a alta sensibilidade desta bactéria, não sendo possível relacionar com a origem.

Com efeito, foi já referido que o vinho pode ser utilizado como agente antilisteria em diversas situações, nomeadamente na elaboração de marinadas tradicionais (Friedman *et al.*, 2007).

Apesar de existir uma diferença significativa ($p < 0,05$) na resistência ao vinho tinto relacionada com a origem o mesmo não se pode assumir em ambiente gastrointestinal simulado, devido a apenas se ter testado um isolado de cada origem. No entanto foi observado que é possível encontrar-se diferenças comportamentais por parte de diferentes isolados às condições impostas pela ambiente gástrico simulado, com ou sem adição de vinho. Verificou-se também que o comportamento destas bactérias nas condições gastrintestinais é fortemente influenciado pela natureza da matriz alimentar. Os resultados encontrados reforçam a grande importância da matriz alimentar no processo de resistência ao ambiente gastrointestinal por parte de *L. monocytogenes*, sendo que uma matriz com forte componente lipídica e proteica é mais efectiva na protecção oferecida às células que uma matriz alimentar apenas com forte componente em hidratos de carbono e baixo pH associado.

Apesar da possibilidade que o vinho oferece como agente de protecção contra infecções por *L. monocytogenes*, essa possibilidade deve ser interpretada com precaução, visto os modelos *in vitro* proporcionarem uma limitada capacidade de extrapolação para sistemas *in vivo*.

6 – Trabalho futuro

Para relacionar a sensibilidade perante vinho tinto de *Listeria monocytogenes* com a origem dos isolados (clínica e alimentar), seria importante, para trabalhos futuros, aumentar o número de amostras e serótipos para ambas as origens. Também se poderia diversificar o número de bebidas consumidas à refeição (p. ex. sumos de fruta, vinho branco) e perceber de que forma o comportamento observado era ou não exclusivo do vinho tinto.

Para comprovar se realmente a co-ingestão de vinho, ou outras bebidas, à refeição diminuí a taxa de infecção por *L. monocytogenes* seria pertinente relacionar dados epidemiológicos sobre surtos de listeriose e o consumo de vinho associado a esses surtos. Para além de estudos epidemiológicos, seria interessante, para contornar as limitações impostas naturalmente por modelos *in vitro*, realizar estudos *in vivo* onde houvesse uma efectiva co-ingestão de vinho com alimentos contaminados com estirpes marcadamente patogénicas,

Estas sugestões poderiam ser alargadas a outros microrganismos patogénicos relacionados com a indústria alimentar.

Bibliografia

Allerberger, F., Wagner, M., 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16: 16-13

Almeida, G. N., Gibbs, P. A., Hogg, T. A., Teixeira, P. C., 2006. Listeriosis in Portugal: an existing but under reported infection. *BMC Infectious Diseases* 6:153-159

Atlas, R. M., 1997. Principles of Microbiology, 2th edition Mcgraw-Hill, United State of America pp. 467

Avery, S. M., Buncic, S., 1997. Differences in pathogenicity for chick embryos and growth kinetics at 37°C between clinical and meat isolates of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4°C. *International Journal of Food Microbiology* 34: 319-327

Azizoglu, R. O., Osborne, J., Wilson. S., Kathariou, S., 2009. Role of growth temperature in freeze-thaw tolerance of *Listeria* spp.. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (16): 5315-5320

Badosa, W., Trias, R., Parés, D., Pla, M., Montesino, E., 2008. Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in catalonia (Spain) using normalised plate-counting methods and real time polymerase chain reaction (QPCR). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 605-611

Bakker, H. C., Bundrant, B. N., Fortes, E. D., Orsi, R. H., Wiedmann, M., 2010. A population genetics-based and phylogenetic approach to understanding the evolution of virulence in the genus *Listeria*. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (18): 6085-6100

Barbosa, J., Borges, S., Magalhães, R., Ferreira, V., Santos, J.S., Almeida, G., Gibbs, P., Teixeira, P., 2011. Behaviour of *Listeria monocytogenes* isolates through gastrointestinal tract passage simulation, before and after two sub-lethal stresses. *Food Microbiology* 1-5

Barmpalia-Davis, I. M., Geornaras, I., Kendall, P. A., Sofos, J. N., 2008. Differences in Survival among 13 *Listeria monocytogenes* strains in a dynamic model of the stomach and small intestine. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (17): 5563-5567

Baydar, N. G., Özkann G., Sagdiç, O., 2003. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control* 15: 335–339

Becker, L. A., Çetin, M. S., Hutkins, R. W., Benson, A. K., 1998. Identification of the gene encoding the alternative sigma factor σ^B from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *Journal of Bacteriology* 180 (17): 4547-4554

Bernal, G. D., Altrock, S. M., Zorn, B. G., Scotti, M., Hermann, P., Monzó, H. J., Lacharme, L., Kreft, J., Vázquez-Boland, J. A., 2006. A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins. *Molecular Microbiology* 59 (2): 415-432

Boba, N., Tonkic, M., Budimir, D., Modun, D., Sutlovic, D., Punda-Polic, V., Boban, M., 2010. Antimicrobial effects of wine: separating the role of polyphenols, pH, ethanol, and other wine components. *Journal of Food Science* 75 (5): 322-326

Bonaventura, G. D., Piccolomomini, R., Paludi, D., D’Orio, V., Vergara, A., Conter, M., Ianieri, A., 2007. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*: 1364-5072

Bortolussi, R., 2008. Listeriosis: a primer. *Public Health*: 8: 179

Brosch, R., Catimel, B., Milon, G., Buchrieser, C., Vindel, E., Rocourt, J., 1993. Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains from various sources (food, human, animal) in immunocompetent mice and its association with typing characteristics. *Journal of Food Protection* 56 (4): 296-301

Buncic, S., Avery, S. M., Rocourt, J., Dimitrijevic, M., 2000. Can food-related environmental factors induce different behavior in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? *International Journal of Food Microbiology* 65: 201-212

Buncic, S., Avery, S. M., Rocourt, J., Dimitrijevic., 2000. Can food-related environmental factors induce different behavior in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? *International Journal of Food Microbiology* 65: 201-212

Campos, F. M., Couto. J.A., Figueiredo, A.R., Tóth, I. V., Rangel, A. O. S. S., Hogg, T. A., 2009. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 135: 144–151

Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., García-Fernández, M. C., 2000. Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology* 65: 75-82

Cardoso, A. D., Carvalheira, J., Coimbra, M. A., Rocha, A. 2005. Tecnologia dos Vinhos, Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral, Coimbra, pp. 29-33; 108-109

Carneiro, A., Couto, J. A., Mena, C., Queiroz, J., Hogg, T., 2007. Activity of wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control* 19:800-805

Carpentier, B., Cerf., 2011. Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology* 145: 1-8

Chan, M. M., 2002. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochemical Pharmacology* 63(2):99–104

Cole, M. B., Jones, M. V., Holyoak, C., 2008. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*. 69: 63-72

- Conter, M., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A., Ianieri, A., 2008. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 128: 497-500
- Conway, P. L., Gorbach, S. L., Goldin, B. R., 1986. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science* 70: 1-12
- Cordano, A. M., Jacquet, C., 2009. *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: prevalence and strain characterization. *International Journal of Food Microbiology* 132: 176-179
- Corral, F., Buchanan, R., Bencivengo, M. M., Cooke, P. H., 1990. Quantitative comparison of selected virulence associated characteristics in food and clinical isolates of *Listeria*. *Journal of Food Protozoology* 53: 1003-1009
- Davis, M. J., Coote, P. J., O'Byrne, C. p., 1996. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology* 142: 2976-2982
- Delaquis, A. W., Stanich, K., Toionon, P., 2002. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology* 20: 305-311
- Douglas, A. Bronze, M. S., 2008. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 53:151-165
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P., 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 3819-3822
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R., 2007. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, American Society of Microbiology, Washington D. C., pp. 14; 725; 733-735

Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Cossart, P., 2002. *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Molecular Microbiology* 45: 1095–1106

Dykes, G. A., Moorhead, S. M., 2000. Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. *International Journal of Food Microbiology* 56: 161-166

EFSA, 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in 2009. *The EFSA Journal* 9 (3): 2090

European Centre for Disease Prevention and Control. 2010. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe. ECDC. Stockholm, pp.84-87

Farber, J. M., Peterkin, P. I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*: 476-511

Felício, M. T., Ramalheira, R., Ferreira, V., Brandão. T., Silva, J., Hogg, T., Teixeira, P., 2011. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* from alheiras, traditional Portuguese sausage during cooking. *Food Control* 22: 1960-1964

Fernandes, J., Gomes, F., Couto, J. A., Hogg, T., 2006. The antimicrobial effect of wine on *Listeria innocua* in a model stomach system. *Food Control* 18 (12): 1477-1483

Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Felício, M. T., Mena, C., Hogg, T., Gibbs, P., Teixeira, P., 2005. Characterisation of *alheiras*, traditional sausages produced in the North of Portugal, with respect to their microbiological safety. *Food Control* 18: 436-440

Friedman, M., Henika, P. R., Levin, C. E., Mandrell, R. E. 2007. Recipes for Antimicrobial wine marinades against *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enteric*. *Journal of Food Science* 27 (6):207/213

García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo E., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V. 2007. Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control* **19**:835–841

Gardiner, G., Stanton, C., Lynch, P. B., Colliuns, J. K., Fitzgerald, G., Ross, P. R., 1999. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *Journal of Dairy Science* **82**: 1379-1387

Garner, M. R., James, K. E., Callahan, M. C., Wiedmann, M., Boor, K. J., 2006. Exposure to salt and organic acids increases the ability of *Listeria monocytogenes* to invade Caco-2 cells but decreases its ability to survive gastric stress. *Applied and Environmental Microbiology* **72 (8)**: 5384-5396

Giannella, R. A., Broitman, S. A., Zamcheck, N., 1972. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. *International Journal in Gastroenterology* **13**: 251-256

Guillet, C., Lambert, O. J., Monnier, A. Leclercq, A., Mechai, F., Bruneel, M. F. M., Bielecka, M. K., Scotti, M., Disson, O., Berche, P., Boland, J. V., Lortholary, O., Lecuit, M., 2010. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases* **16 (1)**: 136-139

Harding, C., Maidment, C., 1996. An investigation into the anti-bacterial effects of wine and other beverages. *Journal of Biological Education* **30**:237–9

Hof, H., 2003. History and epidemiology of listeriosis, *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **35**: 199–202.

Hsiao, C. P., Siebert, K. J., 1999. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **47** 189–201

Immerseel, F. V., Russel, J. B., Flythe, M. D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. 2007. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology* **35**: 182-188

Jay, J. M., 1996. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. *Food Control* **7** (415): 209-214

Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. 2005. Modern Food Microbiology, 1ª edição. Springer, New York, pp. 306; 332.

Jayaprakasha, G. K., Selvi, T., Sakariah, K.K., 2002. Antibacterial and antioxidant activities

Just, J. R., Daeschel, M. A. 2003. Antimicrobial effects of wine on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in a model stomach system. *Journal of Food Science* **68**: 285-290

Kazmierczak, M. J., Mithoe, S. C., Boor, K. J., Wiedmann, M., 2003. *Listeria monocytogenes* σ^B regulates stress response and virulence functions, *Journal of Bacteriology* **185** (19): 5722-5734

King, T., Ferenci, T., Szabo, E. A., 2002. The effect of growth atmosphere on the ability of *Listeria monocytogenes* to survive exposure to acid, proteolytic enzymes and bile salts. *International Journal of Food Microbiology* **84**: 133– 143

Knoll, C., Fritsch, S., Schnell, S., Grossmann, M., Rauhut, D., 2011. Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white. *Wines Food Science and Technology* **44**: 2077-2086

Konishi, Y. S., Hara-Kudo, Y., Iwamoto, T., Kondo, K. 2001. Wine has activity against entero-pathogen bacteria *in vitro* but not *in vivo*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **65** (4) 954-957

Kozak, J., Balmer, T., Byrne, R., Fisher, K., 1996. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products. *Food Control* **7** (415): 215-221

Krull, C., Luiten-Schuite, A., Baan, R., Verhagen, H., Mohn, G., Feron, V., Havenarr, R., 2000. Application of a dynamic in vitro gastrointestinal tract model to study the availability of food mutagens, using heterocyclic aromatic amines as model compounds. *Food and Chemical Toxicology* 38: 783-792

Low, J. C., Donachie, W., 1997. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary Journal* 153: 9-29

Lunden, J., Autio, T., Korkeala, H., 2002. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. *Journal of Food Protozoology* 65: 1129–1133

Madigan, M. T., Martinko, J. M., 2006. Brock Biology of Microorganisms, 11^a edição. Pearson Prentice Hall, New Jersey, pp. 937

Mahady, G. B., Pendland, S. L., 2000. Resveratrol inhibits the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. *American Journal of Gastroenterology* 95(7):1849-1854

Marimón, J. M., Bujanda, L., Gutierrez-Stampa, M. A., Cosme, A., Arenas, J. I. 1998. In vitro bactericidal effect of wine against *Helicobacter pylori*. *American Journal of Gastroenterology* 93(8):1392

Martinsen, T. C., Bergh, K., Waldum, H. L., 2005. Gastric juice: a barrier against infectious diseases. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 96: 94-102

McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J., Jewell, K., 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology* 92: 15-33

Mena, C., Almeida, G., Carneira, L., Teixeira, P., Hogg, T., Gibbs, P. A., 2003. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology* 21: 213-216

Miles, A. A., Misra, S. S., 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 38(6): 732-734.

Moorhead, S. M., Dykes, G. A., 2003. The role of the *sigB* gene in the general stress response of *Listeria monocytogenes* varies between a strain of serotype 1/2a and a strain of serotype 4c. *Current Microbiology* 46: 461-466

Moretro, T., Daeschel, M. A. 2004. Wine is bactericidal to foodborne pathogens. *Journal of Food Science* **69**, (9) 251-257

Motarjemi, Y., Adams, M. 2006. Emerging Foodborne Pathogens, 1^a edição. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 410

Murray, P. R., Tenover, S. R., Kobayashi, G. S., Pfaller, M. A. 2002. Medical Microbiology, 4^a edição. Mosby, St. Louis, pp. 245-247

O'Driscoll, B., Gahan, C., Hill, C., 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (5): 1693-1698

Oomen, A.G., Rompelberg, C. J. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P. K. H., Sips, A. J. A., 2003. Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **44**: 281-287.

Olier, M., Rousseaux, S., Piveteau, P., Lemaître, J. P., Rousset, A., Guzzo, A., 2004. Screening of glutamate decarboxylase activity and bile salt resistance of human asymptomatic carriage, clinical, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* *International Journal of Food Microbiology* 93: 87-99

Osaili, T. M., Alaboudi, A. R., Nesiari, E. A., 2011. Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. *Food Control* 22: 586-590

Pan, Y., Breidt, Jr., Kathariou, S., 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (12) 7711-7717

Peel, M., Donache, W., Shaw, A., 1988. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and Western Blotting. *Journal of General Microbiology* 134: 2171-2178

Peng, S. C., Cheng, S. Y., Sheu, F., Su, C. H., 2007. The antimicrobial activity of heyneanol A extracted from the root of taiwanese wild grape. *Journal of Applied Microbiology* 105: 485–491

Peterson, W.L., Mackowiak, P.A., Barnett, C.C., Marling-Cason, M., Haley, M.L., 1989. The human gastric barrier: mechanisms of action, relative antibacterial activity, and dietary influences. *Journal of Infectious Diseases* 159 (5): 979-83

Picot, A., Lacroix, C., 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal* 14: 505-515

Pimental-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Liobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., Vernon-Cartes, E. J., 2009. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International* 42: 292–297

Ponniah, J., Robin, T., Paie, M. S., Radu, S., Ghasali, F. M., Kqueen, C. Y., Nishibuchi, M., Najkaguchi, Y., Malakar., 2009. *Listeria monocytogenes* in raw salad vegetables sold at retail level in Malaysia. *Food Control* 21: 774-778

Ramalheira, R., Almeida, M., Azeredo, J., Brandão, T. R. S., Almeida, G., Silva, J., Teixeira, P., 2010. Survival of clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes* through simulated gastrointestinal tract conditions. *Foodborne Pathogens and Disease* 7 (2): 121-129

Ramaswamy, V., Cresence, V. M., Rejitha, J. S., Lekshmi, M. U., Dharsana, K. S., Prasad, S. P., Vijila, H. M., 2006. *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 40: 4-13

Rhodes, P. L., Mitchell, J. W., Wilson, M. W., Melton, L. D., 2006. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier International. *Journal of Food Microbiology*: 281 – 286

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. 1999. Handbook of Enology: Volume 2 - The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. John Wiley & Sons, Ltd., England pp. 41-55

Rico-Muñoz, B., Davidson, P. M. 1987. Effect of selected phenolic compounds on the membrane bound adenosine triphosphatase of *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology* 4: 239-249

Robinson, R. K., Batt, C. A., Patel, P. D. 2000. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, London, pp. 254-255 (Robinson *et al*, 2000)

Smith, J. L., 2003. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *Journal of Food Protection* 66 (7): 1292-1303

Soleas, G. J., Dam, J., Carey, M., Goldberg, D.M., 1997. Toward the fingerprinting of wines: cultivar-related patterns of polyphenolic constituents in Ontario wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(10): 3871–80

Soleas, G. J., Eleftherios, P.D., Goldberg, D. M. 1997. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 11:287–313

Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P., 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection* 9 (10): 1236-1243

Thimothe, J., Bonsi, I. A., Padilla-Zakour, O. I., Koo, Hyun. 2007. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis* Interspecific Hybrids) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 10200-10207

Turnberg, L. A., Anthony-Mote, A., 1969. The quantitative determination of bile salts in bile using thin-layer chromatography and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Clinica Chimica Acta* **24**: 253-259

Vaquero, M. J. R., Alberto, M. R., Nadra, M. C. M., 2005. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* **18**: 93–101

Vialette, M., Pinon, A., Chasseignaux, E., Lange, M., 2002. Growths kinetics comparison of clinical and seafood *Listeria monocytogenes* isolates in acid and osmotic environment. *International Journal of Food Microbiology* 82: 121-131

Vialette, M., Pinon, A., Chasseignaux, E., Lange. M., 2003. Growths kinetics comparison of clinical and seafood *Listeria monocytogenes* isolates in acid and osmotic environment. *International Journal of Food Microbiology* 82: 121–131

Waite, J. G., Daeschel, M. A. 2007. Contribution of wine components to inactivation of food-borne pathogens. *Journal of Food Science* **72**, nr 7: 286-291

Webb, A. D. 1985. Chemistry of Winemaking, 6th edition. American Chemical Society, Texas, pp.311

Werbrouck, H., Vermeulen, A., Coillie, E. V., Messens, W., Herman, L., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., 2009. Influence of acid stress on survival, expression of virulence genes and invasion capacity into Caco-2 cells of *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *International Journal of Food Microbiology* 134: 140-146

Whitman, W. B., DeVos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R. Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – volume 3, 2^a edição. Springer Dordrecht Heidelberg, London, pp. 244

Wiedman, M., Bruce, J. L., Keating, C., Johnson, A. Y., McDonough, P. L., Batt, C. A., 1997. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infection and Immunity* 65 (7): 2707-1716

Wiedmann, M., Arvik, T., Hurley, R. J., Boor, K. J., 1998. General stress transcription factor σ^B and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* 180 (14): 3650-3656

Wonderling, L. D., Wilkinson, B. J., Bayles, D. O., 2004. The *htrA* (*degP*) gene of *Listeria monocytogenes* 10403S is essential for optimal growth under stress conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (4): 1935-1945

Yan, H., Neogi, S. B., Mo, Z., Guan, W., Shen, Z., Zhang, S., Li, L., Yamasaki, S., Shi, L., Zhong, N., 2010. Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005–2007. *International Journal of Food Microbiology* 144: 310-316