

Avaliação da multiplicação de *Listeria monocytogenes* e da atividade antimicrobiana do Biomax D® em nata

Evaluation of multiplication of *Listeria monocytogenes* and antimicrobial activity of Biomax D® in cream

Ana Paula Biasus¹, Ana Paula Chaves¹, Wladimir Padilha da Silva², Cleuzir da Luz¹ e Liziane Schittler^{1*}

¹ Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Educação Superior do Oeste, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, CEP 89870-000, Pinhalzinho/SC, Brasil;

² Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, CEP:96010-900, Pelotas/RS, Brasil.

(*E-mail: lizianeschittler@gmail.com)

<http://dx.doi.org/10.19084/RCA15084>

Recebido/received: 2015.07.15

Aceite/accepted: 2015.11.17

RESUMO

Avaliou-se a multiplicação de *Listeria monocytogenes* em nata, um derivado lácteo com alto teor de gordura, bem como a atividade antilisteria do Biomax D® neste alimento. A atividade antilisteria do Biomax foi comparada com a da nisina. Foram utilizados seis tratamentos: T1: nata + 10² UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes*; T2: nata + 10² UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* + 2,5ppm de nisina; T3: nata + 10² UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* + 1,5% de Biomax; T4: nata + de 10⁵ UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes*; T5: nata + de 10⁵ UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* + 2,5ppm de nisina; T6: nata + de 10⁵ UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* + 1,5% de Biomax. A contagem de *L. monocytogenes* foi realizada em três tempos de armazenamento a 8°C (zero, 6^o, 14^o e 20^o dia), com médias variando entre 2 e 10 log UFC.g⁻¹ nos tratamentos sem adição de nisina e Biomax, entretanto, houve eliminação do micro-organismo nos tratamentos adicionados dos antimicrobianos. Verificou-se que *L. monocytogenes* se desenvolve em nata, podendo atingir elevados níveis de contaminação, mesmo quando apresentava baixas contagens iniciais. Além disso, observou-se que Biomax possui atividade antilisteria semelhante à nisina neste derivado lácteo, apresentando potencial para ser utilizado como antimicrobiano natural para o controle de *L. monocytogenes* em alimentos gordurosos.

Palavras-chave: antimicrobianos, Biomax D®, nata, nisina.

ABSTRACT

The proliferation of *Listeria monocytogenes* in cream, a milk derivative with high fat content, was evaluated as well as the anti-listerial activity of Biomax D® in this type of food. Antilisterial activity of Biomax was compared with nisin. Six treatments were used: T1: Cream + 10² CFU.g⁻¹ of *L. monocytogenes*; T2: Cream + 10² CFU.g⁻¹ *L. monocytogenes* + 2,5ppm nisin; T3: Cream + 10² CFU.g⁻¹ *L. monocytogenes* + 1.5% Biomax; T4: Cream + 10⁵ CFU.g⁻¹ of *L. monocytogenes*; T5: Cream + 10⁵ CFU.g⁻¹ *L. monocytogenes* + 2,5ppm nisin; T6: Cream + 10⁵ CFU.g⁻¹ *L. monocytogenes* + 1.5% Biomax. *L. monocytogenes* counts were performed on three days storage at 8 °C (zero, 6, 14 and 20th day), with averages ranging between 2 and 10 log CFU.g⁻¹ in treatments without the addition of nisin or Biomax®. However, there was elimination of the microorganism when the antimicrobials were added. It was found that *L. monocytogenes* is able to grow in cream, reaching high levels of contamination, even when it presents low initial counts. In this dairy derivative, Biomax D® presents antilisterial activity similar to nisin and might be used as a natural antibiotic for the control of *L. monocytogenes* in fatty foods.

Keywords: antimicrobials; Biomax D®, cream, nisin.

INTRODUÇÃO

Atualmente, há uma busca por alimentos mais saudáveis, seguros, e com aspecto mais próximo ao natural. Para atender esta demanda do mercado, as indústrias de alimentos têm utilizado a bioconservação, que consiste na substituição de antimicrobianos obtidos através de síntese química, por compostos naturais de origem microbiana ou vegetal, com atividade antimicrobiana comprovada.

Um exemplo é a nisina, um peptídeo antimicrobiano sintetizado por bactérias lácticas da espécie *Lactococcus lactis*, que tem sido utilizada como conservante pelas indústrias de laticínios, em produtos como queijo e requeijão. Essa bacteriocina possui atividade antagonista contra vários micro-organismos patogênicos, como *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* (Jack *et al.*, 1995). Além da nisina, outras substâncias antimicrobianas naturais têm sido descritas, como, por exemplo, o produto a base de extrato de pomelo e ácido ascórbico, denominado comercialmente de Biomax D®.

O Biomax D® não altera a cor, sabor e odor dos alimentos e tem sido utilizado para o controle de bolores e leveduras na indústria de panificação, entretanto, também apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias como *C. botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus hemolyticus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* e *L. monocytogenes* (Prozin, 2013). Esse produto é comercializado no Brasil, e não necessita registro por apresentar extratos de plantas em sua formulação, conforme preconiza a Resolução nº 23, de 15 de março de 2000, que dispõe sobre Procedimentos básicos para registro e dispensa da obrigatoriedade de registro de produtos pertinentes à área de alimentos (Brasil, 2000).

Listeria monocytogenes é uma bactéria intracelular facultativa que pode causar a listeriose, uma doença que é, principalmente, transmitida por alimentos. Produtos lácteos têm sido identificados como fontes de surtos e casos de listeriose (Cossart, 2011), sendo o leite cru, um veículo importante de contaminação de laticínios por *L. monocytogenes* (Tenenhaus-Aziza *et al.*, 2014). Este micro-organismo apresenta a capacidade de colonizar superfícies em plantas de processamento de alimentos e de formar biofilmes, o que pode

contribuir para sua persistência em indústrias de beneficiamento de leite e derivados.

A nata é um produto lácteo, relativamente rico em gordura (38-50%), que se apresenta como uma emulsão de gordura em água (Brasil, 2012). Apesar de apresentar uma concentração elevada de gordura e ser mantida sob refrigeração, é um alimento pronto para consumo e que pode permitir a multiplicação de bactérias patogênicas psicrotróficas, como *L. monocytogenes*. Desta forma, a nata pode ser veículo de transmissão de listeriose, entre outras doenças de origem alimentar. Aliado a isso, a composição química da matriz alimentícia pode interferir na atividade do antimicrobiano utilizado, em especial alimentos com alto teor de proteínas ou de gorduras (Busatta *et al.*, 2008).

Devido ao exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a multiplicação de *L. monocytogenes* em nata, bem como a atividade antimicrobiana de Biomax D® contra esse patógeno. Além disso, objetivou-se comparar a atividade do Biomax D® com a nisina, um antimicrobiano natural amplamente utilizado em derivados lácteos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os antimicrobianos nisina e o produto composto por extrato de pomelo e ácido ascórbico, comercializados com os nomes de Globalnissin® e Biomax D®, respectivamente, foram fornecidos gentilmente pelas empresas Globalfood Sistemas, Ingredientes e Tecnologia para Alimentos Ltda e Prozyn Indústria e Comércio Ltda, respectivamente.

A cepa *L. monocytogenes* Scott A, utilizada neste estudo, pertence à coleção do Laboratório de Microbiologia do curso de Engenharia de Alimentos da UDESC. A cultura, mantida em Tryptic Soy Broth Yeast Extract (TSB-YE/OXOID) adicionado de 1,5% de ágar-ágar (OXOID), foi repicada em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI/OXOID) e incubada a 30°C por 24 horas. Em seguida, diluiu-se a cultura em solução salina peptonada a 0,1% (Merck) até a concentração de 0,5 da escala de Mac Farland, correspondente a 10⁸ Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC mL⁻¹).

Utilizou-se nata de leite bovino, adquirida no comércio, procedente de dois lotes distintos, a qual foi avaliada microbiologicamente pela contagem

total de micro-organismos aeróbios mesófilos, de acordo com a Instrução Normativa Nº 62, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003).

Para avaliar a atividade antimicrobiana de Biomax D® contra *L. monocytogenes* em nata, foram utilizados seis tratamentos contendo 200g de nata cada: Tratamento 1: nata + 10² UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes*; Tratamento 2: nata + 10² UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* + 2,5ppm de nisina; Tratamento 3: nata + 10² UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* + 1,5% de Biomax D®; Tratamento 4: nata + de 10⁵ UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes*; Tratamento 5: nata + de 10⁵ UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* + 2,5ppm de nisina; Tratamento 6: nata + de 10⁵ UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* + 1,5% de Biomax D®. Cada tratamento foi homogeneizado em *Stomacher* (Logen Scientific), e a nata foi fracionada em embalagens plásticas esterilizadas, as quais foram armazenadas a 8°C. O experimento foi realizado em duplicata, com natas fabricadas em datas diferentes. A contagem de *L. monocytogenes* foi realizada logo após o preparo dos tratamentos (tempo zero), no sexto, 14° e 20° dia de armazenamento a 8°C. Para isto, de cada tratamento foram transferidas, assepticamente, 10 g de amostra para sacos plásticos esterilizados tipo *stomacher* e adicionou-se 90 mL de solução salina peptonada a 0,1%. Foram inoculados 0,1 mL das diluições apropriadas na superfície das placas de Petri contendo ágar Oxford (Oxoid) as quais foram incubadas a 37±1°C por 48 h. As placas que apresentaram colônias pequenas, com aproximadamente 2 mm, acinzentadas, com halos enegrecidos e centro côncavo, foram contadas e o resultado foi expresso em log UFC.g⁻¹.

Os dados experimentais referentes às contagens de *L. monocytogenes*, obtidas em cada tratamento, foram ajustados por funções matemáticas pelo Método de Mínimos Quadrados utilizando o software Excel 2007.

Os resultados das contagens foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, com nível de 95% de confiabilidade. Utilizou-se o software livre Assistat 7.7beta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 podem ser visualizadas as contagens de *L. monocytogenes* em nata submetidas aos tratamentos com e sem os antimicrobianos nisina e Biomax D® nos tempos zero (logo após o preparo), sexto, 14° e 20° dia de armazenamento a 8°C.

Os Tratamentos 1, 4, 5 e 6 foram ajustados pelas funções polinomiais de grau 2 (dois), pois apresentaram os melhores coeficientes de determinação (R²), mais próximos de 1, que estão representadas nas equações 1 a 4, respectivamente:

$$y = 0,042x^2 + 0,2885x + 2,0848 \quad R^2 = 0,9968 \quad (\text{Eq.1})$$

$$y = 0,0131x^2 - 0,0188x + 5,129 \quad R^2 = 0,9977 \quad (\text{Eq.2})$$

$$y = 0,0131x^2 - 0,0188x + 5,129 \quad R^2 = 0,9884 \quad (\text{Eq.3})$$

Quadro 1 - Médias das contagens (log₁₀ UFC.g⁻¹) na nata após os tratamentos com *L. monocytogenes* e os antimicrobianos durante 20 dias de armazenamento a 8° C. Tratamento 1: nata + 10² UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes*; Tratamento 2: nata + 10² UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* + 2,5ppm de nisina; Tratamento 3: nata + 10² UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* + 1,5% de Biomax D®; Tratamento 4: nata + de 10⁵ UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes*; Tratamento 5: nata + de 10⁵ UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* + 2,5ppm de nisina; Tratamento 6: nata + de 10⁵ UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* + 1,5% de Biomax D®

Tratamento	Tempo (dias)			
	0	6	14	20
1	2,00 ^{aA} ± 0,00	4,18 ^{bA} ± 0,57	6,74 ^{cA} ± 0,04	9,63 ^{dA} ± 0,61
2	1,16 ^{aB} ± 0,15	2,14 ^{aB} ± 0,99	1,00 ^{aB} ± 0,00	1,00 ^{aB} ± 0,00
3	1,44 ^{aB} ± 0,40	1,77 ^{aB} ± 0,68	1,16 ^{aB} ± 0,15	1,00 ^{aB} ± 0,00
4	5,08 ^{aA} ± 0,17	5,61 ^{bA} ± 0,22	7,31 ^{cA} ± 0,33	10,04 ^{dA} ± 0,12
5	4,23 ^{aA} ± 0,76	4,06 ^{aAB} ± 1,05	3,19 ^{aB} ± 1,09	1,00 ^{bB} ± 0,00
6	4,24 ^{aA} ± 0,02	3,74 ^{bB} ± 0,018	3,08 ^{abB} ± 0,58	1,00 ^{cB} ± 0,00

^{aB}Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0,05) entre os tratamentos. ^{ab}Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste Tukey (p<0,05) entre o tempos de armazenamento. Letras iguais não diferem entre si significativamente.

$$y = -0,094x^2 + 0,0371x + 4,1303 \quad R^2 = 0,9714$$

(Eq.4)

Já os Tratamentos 2 e 3, foram ajustados pelas funções polinomiais de grau 3 (três), estando representadas pelas equações 5 e 6, respectivamente:

$$y = 0,0016x^3 - 0,0539x^2 + 0,4289x + 1,16 \quad R^2=1$$

(Eq.5)

$$y = 0,0006x^3 - 0,0223x^2 + 0,1655x + 1,44 \quad R^2=1$$

(Eq.6)

Observa-se que nos Tratamentos 1 e 4, onde foi adicionado à nata somente *L. monocytogenes*, nas concentrações de 10^2 e 10^5 UFC.g⁻¹, respectivamente, as médias das contagens no 20º dia de armazenamento foram de 9,63 log UFC.g⁻¹ no Tratamento 1 e 10 log UFC.g⁻¹ no Tratamento 4, não havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre essas contagens (Quadro 1). Este resultado demonstra que *L. monocytogenes* pode se desenvolver em nata durante o período de armazenamento e chegar a concentrações celulares elevadas, mesmo quando o produto apresenta baixas concentrações iniciais (10^2 UFC.g⁻¹) do micro-organismo. Resultado semelhante foi relatado por Pimentel-Filho *et al.* (2014), que inocularam *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal, numa concentração inicial de 10^3 UFC.g⁻¹ e, após 12 dias de armazenamento a 8-10°C, a concentração desse micro-organismo atingiu 10^8 UFC.g⁻¹.

Quando foram adicionados nisina ou Biomax D® à nata (Tratamentos 2, 3, 5 e 6) observou-se que houve uma rápida ação das substâncias antimicrobianas, havendo redução de aproximadamente 1 log UFC.g⁻¹ na contagem de *L. monocytogenes* logo após o preparo dos Tratamentos (tempo zero) em comparação aos Tratamentos 1 e 4, sem adição dos antimicrobianos (Quadro 1). Comportamento similar foi relatado por Bhatti *et al.* (2004), os quais verificaram uma redução de 1 a 2 log na concentração de *L. monocytogenes* logo após a adição de 3 ppm de nisina em leite pasteurizado adicionado de 4 log do micro-organismo.

Alguns autores, como Aasen *et al.* (2003) e Busatta *et al.* (2008), relatam que o teor de gordura pode influenciar a eficácia dos antimicrobianos. Porém, neste trabalho, verificou-se que a nisina, bem como o Biomax D®, apresentaram atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* em nata, que é um

derivado lácteo que apresenta uma concentração alta de gordura (38 - 50%).

Neste estudo utilizou-se a nata que passou pelo processo de homogeneização da gordura. De acordo com Bhatti *et al.* (2004), a atividade antilisteria da nisina está diretamente relacionada com a forma que se encontra o glóbulo de gordura no leite: utilizando 125 UI.mL⁻¹ nisina, o que corresponde a 3 ppm de nisina, contra 4 log de *L. monocytogenes* em leite *in natura* com 3,5% de gordura, o micro-organismo permaneceu viável na concentração de 3 log UFC.mL⁻¹ no 15º dia de armazenamento a 5°C, porém, em leite homogeneizado e pasteurizado, houve eliminação de *L. monocytogenes* no sexto dia de armazenamento a 5°C. A atividade antimicrobiana da nisina pode variar de acordo com a absorção na superfície a qual foi incorporada. Isso ocorre pela diferença no tamanho do glóbulo de gordura, tendo em vista que este apresenta tamanho de 3 µm no leite *in natura* e, no leite homogeneizado, apresenta 0,5 µm.

Avaliando-se o Quadro 1, observa-se que quando se utilizou a interação entre 2,5 ppm de nisina e *L. monocytogenes* na concentração de 10^2 UFC.g⁻¹ (Tratamento 2), houve a redução para 1 log UFC.g⁻¹ do micro-organismo no 14º dia de armazenamento. Já no Tratamento 3, onde foi testado 1,5% de Biomax D® em *L. monocytogenes*, também na concentração de 10^2 UFC.g⁻¹, a concentração microbiana reduziu para 1,16 log UFC.g⁻¹, no mesmo período de tempo. No entanto, comparando-se as médias, verifica-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas contagens de *L. monocytogenes* entre estes dois tratamentos no 14º dia de armazenamento, demonstrando que a nisina e o Biomax D® apresentaram o mesmo comportamento.

Avaliando-se a ação do Biomax D® contra 10^5 UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* (Tratamento 6), verifica-se que a contagem celular, que foi de 4,24 log UFC.g⁻¹ no tempo zero, passou a 3,74 log UFC.g⁻¹ no sexto dia e 3,08 log UFC.g⁻¹ no 14º dia de armazenamento a 8°C (Quadro 1). Já no tratamento 5 (nisina contra 10^5 UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes*), a contagem de *L. monocytogenes*, que no tempo zero foi de 4,23 log UFC.g⁻¹, passou a 4,06 log UFC.g⁻¹ no sexto dia e a 3,19 log UFC.g⁻¹ no 14º de armazenamento a 8°C (Quadro 1). Este resultado poderia sugerir que o Biomax D® (Tratamento 6) é mais eficaz contra *L. monocytogenes* do que a nisina (Tratamento 5) no sexto dia de armazenamento, no entanto, não

houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas contagens do micro-organismo entre os Tratamentos 5 e 6, demonstrando que ambos apresentaram eficácia semelhante. Ao se comparar a atividade dos antimicrobianos nisina e Biomax D[®] contra uma mesma concentração de *L. monocytogenes* em nata (Tratamentos 2 e 3 e Tratamentos 5 e 6), observa-se que as contagens do micro-organismo não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$) nos tempos zero, 6^o, 14^o e 20^o dia de armazenamento. Estes resultados demonstram que a nisina e o Biomax D[®], nas concentrações de 2,5 ppm e 1,5%, respectivamente, apresentaram desempenho semelhante contra *L. monocytogenes*, tanto na concentração inicial de 10^2 , quanto de 10^5 UFC.g⁻¹.

A atividade antimicrobiana do extrato de pomelo também foi relatada por outros autores. Gerhardt *et al.* (2012) avaliaram diversos extratos de frutas cítricas, inclusive extrato de pomelo, e verificaram atividade antimicrobiana destes extratos contra as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Entretanto, nenhum estudo científico no Brasil avaliou o efeito do Biomax D[®] como antimicrobiano em alimentos em comparação à nisina. Neste estudo observou-se que o Biomax D[®] foi eficaz no controle de *L. monocytogenes* em nata, apresentando desempenho similar ao da nisina, um antimicrobiano já amplamente utilizado pela indústria láctea, portanto, apresenta potencial de utilização como antimicrobiano natural para uso em alimentos gordurosos.

CONCLUSÃO

A nata é um derivado lácteo com elevado teor de gordura, entretanto, *L. monocytogenes* pode se multiplicar e atingir elevadas contagens celulares, mesmo quando apresenta baixas concentrações iniciais. O Biomax D[®] possui atividade antilisteria semelhante à da nisina neste derivado lácteo, demonstrando potencial de utilização como antimicrobiano natural em alimentos gordurosos, como a nata.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aasen, I.M.; Markussen, S.; Moretro, T.; Katla, T.; Axelsson, L. e Naterstand, K. (2003) - Interactions of the bacteriocins, sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 87, n.1-2, p. 35-43. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00047-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00047-3)
- Bhatti, M.; Veeramachaneni, A. e Shelef, L.A. (2004) - Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 97, n. 2, p. 215-219. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.06.010>
- Brasil (2000). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 23, de 15 de março de 2000 ementa: Dispõe sobre O Manual de Procedimentos Básicos para Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos publicação. *Diário Oficial da União*, 16/03/2000. Anexo 1 e 2, p.23.
- Brasil (2003). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N^o 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial da União*, 18 /09/2003, Seção 1, p. 14.
- Brasil (2012). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 23, de 30 de Agosto de 2012. Regulamento técnico de Identidade e Qualidade de nata. *Diário Oficial da União*, 31/08/2012. Seção1 p. 4.
- Busatta, C.; Vidal, R.S.; Popiolski A.S.; Mossi, A.J.; Dariva, C.; Rodrigues, M.R.A.; Corazza, F.C.; Corazza, M.L.; Vladimir Oliveira, J. e Cansian, R.L. (2008) - Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*, vol. 25, n. 1, p. 207-211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2007.07.003>
- Cossart, P. (2011) - Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. vol. 108, n. 49, p. 19484-19491. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1112371108>
- Gerhardt, C.; Wiest, J.M.; Girolometto, G.; Magnólia, M.A.A.S. e Weschenfelder, S. (2012) - Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana. *Brazilian Journal of Food Technology*, vol. 15, p. 11-17.

- Jack, R.W.; Tagg, J.R. e Ray, B. (1995) - Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiology Reviews*, vol. 59, n. 2, p. 171-200.
- Pimentel-Filho, N.J.; Mantovani, H.C.; Carvalho, A.F.; Dias, R.S. e Vanetti, M.C.D. (2014) - Efficacy of bovicin HC5 and nisin combination against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh cheese. *International Journal of Food Science & Technology*. vol. 49, n. 2, p. 416-422. <http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.12316>
- Prozyn (2013) - *Biomax D: Substituição Natural aos Conservantes*; Guia do fabricante.
- Tenenhaus-Aziza, F.; Daudin, J.J.; Maffre, A., e Sanaa, M. (2014) - Risk-based approach for microbiological food safety management in the dairy: The case of *Listeria monocytogenes* in soft cheese made from pasteurized milk. *Risk Analysis*, vol. 34, n. 1, p. 56-74. <http://dx.doi.org/10.1111/risa.12074>