



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE ALIMENTOS

ANA CLÁUDIA LEITE FIGUEIREDO

Listeria monocytogenes EM PRODUTOS CARNEOS
FATIADOS PRONTOS PARA CONSUMO E AÇÃO DE
ANTIMICROBIANOS NO CONTROLE DA
CONTAMINAÇÃO.

SALVADOR
2015

ANA CLÁUDIA LEITE FIGUEIREDO

Listeria monocytogenes EM PRODUTOS CARNEOS
FATIADOS PRONTOS PARA CONSUMO E AÇÃO DE
ANTIMICROBIANOS NO CONTROLE DA
CONTAMINAÇÃO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dra Rogeria Comastri de Castro Almeida

SALVADOR
2015

Sistema de Bibliotecas da UFBA

Figueiredo, Ana Cláudia Leite.

Listeria monocytogenes em produtos carneos fatiados prontos para consumo e ação de antimicrobianos no controle da contaminação / Ana Cláudia Leite Figueiredo. - 2016.

76 f.: il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rogeria Comastri de Castro Almeida.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2015.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

ANA CLÁUDIA LEITE FIGUEIREDO

***Listeria monocytogenes* EM PRODUTOS CÁRNEOS FATIADOS PRONTOS PARA CONSUMO E AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 31 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Dr.ª. Rogeria Comastri de Castro Almeida
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Dr.ª. Aláise Gil Guimarães
Universidade Federal da Bahia

Dr.ª. Josilene Lima Matos
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos até aqui e por permitir que tudo acontecesse no seu devido tempo, me dando força para sempre seguir em frente.

À minha orientadora Profa Dra Rogeria Comastri de Castro Almeida, pela dedicação, confiança, paciência e pela orientação serena imprescindível na realização desta pesquisa e na minha vida acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, na pessoa da Prof Dra Janice Izabel Druzian e secretária Priscila Oliveira por estarem sempre dispostas a me ajudar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, nas pessoas do Dr. Hoffer e Dra. Dayse Vallin, pela sorotipagem e ensaio de PCR das cepas isoladas.

Às professoras Alaíse Gil Guimarães e Ryzia de Cássia Vieira Cardoso, pelas valiosas contribuições no meu exame de qualificação.

A todos os professores, funcionários e colegas do PGALI, por todo apoio e dedicação. Em especial ao meu amigo e companheiro de jornada Valterney Deus, pelos conselhos, apoio e profunda amizade.

À Escola de Nutrição por permitir a realização das minhas análises no laboratório de controle de qualidade de alimentos. Em especial aos técnicos Luís e Ariosvaldo e ao Sr Vivaldo por dedicarem mais tempo as minhas demandas do que eu poderia esperar.

A todos os meus amigos e familiares, pelo grande incentivo e pela confiança. Enfim, à valiosa participação de todos que, direta ou indiretamente foram de fundamental importância para a realização de mais um sonho.

O trabalho de pesquisa deve ser assumido no desejo. Se essa assunção não se dá, o trabalho é moroso, funcional, alienado. Movido apenas pela necessidade de prestar um exame, de obter um diploma, de garantir uma promoção na carreira. Para que o desejo se insinue no meu trabalho, é preciso que esse trabalho me seja pedido não por uma coletividade que pretende garantir para si o meu labor, a minha pena e contabilizar a rentabilidade do investimento que faz em mim, mas por uma assembléia viva de leitores em que se faz ouvir o desejo do outro, e não o controle da Lei. (BARTHES, 2004, p.99)

FIGUEIREDO, Ana Cláudia Leite. *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos fatiados prontos para consumo e ação de antimicrobianos no controle da contaminação. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

RESUMO

Listeria monocytogenes é o agente causal da listeriose, uma doença que pode atingir mulheres grávidas (e seus fetos), crianças, idosos e indivíduos com o sistema imunológico comprometido. Os alimentos são reconhecidamente fontes primárias da transmissão desta bactéria para o homem e a mesma já foi isolada de uma grande variedade de alimentos, principalmente produtos de origem animal. A indústria tem procurado métodos cada vez mais eficazes para o combate do patógeno. Apesar de inúmeros trabalhos evidenciarem os esforços de pesquisadores na busca de soluções com o objetivo de inibir o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em alimentos, ainda são necessárias pesquisas para aumentar o número e a variedade de opções tecnológicas para prevenção e controle do microrganismo em alimentos prontos para consumo. Associado a este fato, há uma maior exigência, por parte dos consumidores, de alimentos mais naturais, sem conservantes químicos e com longa vida útil. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a presença de *L. monocytogenes* em produtos cárneos fatiados prontos para consumo, vendidos a varejo no município de Salvador, BA, e avaliar a eficiência de antimicrobianos considerados seguros para uso (GRAS), Nisina, Bacteriófago P100 e lactato de sódio para controle da contaminação. Para a investigação da ocorrência de *L. monocytogenes* foram colhidas 180 amostras, sendo 90 de presunto suíno e 90 de peito peru. Para isolamento do microrganismo foi utilizado o método da *International Standard* (ISO 11290-1), aplicou-se o meio de cultivo cromogênico ALOA. Para avaliação da eficiência dos antimicrobianos, porções do presunto foram tratadas com: nisina, bacteriófago P100, lactato de sódio isolados e em combinação e posteriormente inoculadas com uma mistura da cepa isolada do presunto (sorotipo ½ a) com a cepa Scott A (sorotipo 4b) proporção 1:1. Os tratamentos das amostras com seus respectivos controles foram efetuados por três vezes, nos tempos zero e três dias (prazo de validade). Todas as contagens obtidas foram convertidas em logaritmos e o número de reduções decimais (RD), calculado através da diferença entre a contagem inicial das células (controle *Listeria*) e a contagem final após os tratamentos. Para a comparação entre os tratamentos utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para determinar a existência de diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$). A incidência de *Listeria monocytogenes* foi de 2,2% e 3,3% nas amostras de presunto suíno e peito de peru fatiados respectivamente, todos os isolados pertenciam ao sorotipo ½ a. A eficácia dos antimicrobianos nisina e lactato de sódio foi afetada pela refrigeração. Entretanto, o tratamento com o bacteriófago P100 apresentou eficácia no controle de *L. monocytogenes* durante a refrigeração, demonstrando ser esse o método de escolha para o controle da bactéria no alimento estudado.

Palavras Chaves: Segurança de Alimentos, Bioconservação, Antimicrobianos.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is the causative agent of listeriosis, a disease that can reach pregnant women (and their fetuses), children, the elderly and individuals with compromised immune systems. The foods are known primary sources of transmission of the bacteria to humans and it has been isolated from a wide variety of foods, especially animal products. The industry has been looking increasingly effective methods for pathogen combat. Although many papers evidencing research efforts to find solutions in order to inhibit the growth of *L. monocytogenes* in foods, are still necessary research to increase the number and variety of technological options for prevention and control of microorganisms in packaged foods for consumption. Associated to this, there is a greater demand by consumers, more natural foods without chemical preservatives and long service life. In this context, the aim of this study was to investigate the presence of *L. monocytogenes* in sliced meat products ready for consumption, sold at retail in the city of Salvador, and evaluate the antimicrobial efficiency considered safe for use (GRAS), Nisin, Bacteriophage P100 and sodium lactate to control contamination. To evaluate the occurrence of *L. monocytogenes* were collected 180 samples, 90 of 90 pig ham and turkey breast. For isolation of the microorganism was used the method of International Standard ISO 11290-1, with the chromogenic culture medium ALOA. To evaluate the antimicrobial efficiency, ham portions were treated with: nisin, bacteriophage P100, isolated sodium lactate and in combination and subsequently inoculated with a mixture of strain isolated Ham (serotype ½) with Scott A strain (serotype 4b) in the ratio 1: 1. The treatments of the samples with their respective controls were performed three times at zero and three days (expiration date). All counts obtained were converted into logarithms and the number of decimal reductions (DR) calculated from the difference between initial cell counts (*Listeria* control) and the final count after the treatment. To compare the treatments we used the ANOVA and Tukey test to determine the existence of statistically significant differences ($p < 0.05$). The incidence of *Listeria monocytogenes* was 2.2% and 3.3% in samples of porcine ham and turkey breast sliced respectively, all isolates belonging to serotype ½. The antimicrobial efficacy of nisin and sodium lactate was affected by the cooling. However, treatment with bacteriophage P100 showed efficacy in *L. monocytogenes* control when cooling, demonstrating that this is the method of choice for the control of bacteria in the studied food.

Keywords: Food safety, biopreservation, antimicrobials.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1. Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em produtos cárneos fatiados prontos para consumo no Brasil	19
--	----

CAPITULO 2

Tabela 1. Iniciadores, tamanho dos amplicons e condições de amplificação na análise de PCR para marcadores genéticos investigados no estudo.....	41
---	----

Tabela 2. Isolamento de <i>Listeria</i> spp. de produtos cárneos fatiados prontos para consumo.....	42
--	----

CAPITULO 3

Tabela 1. Contagem (UFC/g) de <i>Listeria monocytogenes</i> inoculadas artificialmente em presunto suíno.....	61
--	----

Tabela 2. Redução na população de <i>L. monocytogenes</i> após tratamento com bacteriófago P100.....	63
---	----

Tabela 3. Redução na população de <i>L. monocytogenes</i> após tratamento com a bacteriocina nisina (50µg/L).....	65
--	----

Tabela 4. Redução da população de <i>L. monocytogenes</i> após tratamento com lactato de sódio 2% (p/v).....	66
---	----

Tabela 5. Redução na população de <i>L. monocytogenes</i> após tratamento com lactato de sódio 2%(p/v) e nisina (50 µg/L), na proporção 1:1.....	67
---	----

Tabela 6. Redução na população de *L. monocytogenes* após tratamento com o bacteriófago P100 e nisina (50 µg/L).....68

Tabela 7. Valores médios das contagens de *L. monocytogenes* (sorotipo 1/2a) isolada de presunto suíno e *L. monocytogenes* Scott A (sorotipo 4b), em função da adição ou não dos tratamentos antimicrobianos, nos tempos zero e três dias.....70

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
OBJETIVOS	12
GERAL	12
ESPECÍFICOS	12

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 <i>Listeria monocytogenes</i>	13
2 <i>Listeria monocytogenes</i> como agente etiológico da listeriose.....	15
3 Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> em produtos cárneos	17
4 Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> em produtos cárneos para consumo.....	18
5 Uso da Tecnologia de Barreiras para controle de <i>L. monocytogenes</i> em alimentos.....	22
5.1 Bacteriocinas.....	23
5.2 Bacteriófagos.....	24
5.3 Sais de ácidos orgânicos.....	25
REFERENCIAS	26

CAPÍTULO 2

Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos fatiados pronto para consumo comercializados em supermercados de Salvador-Ba.

Resumo	35
Abstract	35
Introdução	36
Materiais e Métodos	38
Amostragem e procedimentos laboratoriais	38
Investigação de <i>Listeria monocytogenes</i> em presunto e peito de peru fatiados.....	39
Sorotipagem.....	40
Confirmação das Cepas isoladas por PCR Multiplex.....	40
Resultados e Discussão.....	42

Conclusão	46
Agradecimentos	47
Referencias.....	47

CAPÍTULO 3

Eficácia de antimicrobianos na redução da contaminação por *Listeria monocytogenes* inoculada em presunto suíno.

Resumo.....	54
Abstract	55
Introdução.....	54
Materiais e Métodos.....	57
Determinação do título do bacteriófago (LISTEX TM P 100).....	57
Preparo das cepas bacterianas para inoculação.....	57
Inoculação de <i>L. monocytogenes</i> em presunto suíno cozido e fatiado e uso dos tratamentos com os antimicrobianos.....	58
Enumeração de <i>L. monocytogenes</i> inoculada artificialmente em presunto suíno após os tratamentos.....	59
Análise dos dados.....	59
Resultados e Discussão	60
Título do Bacteriófago.....	60
Adesão de <i>L. monocytogenes</i> em presunto suíno cozido e fatiado.....	61
Eficácia dos tratamentos antimicrobianos no controle <i>L. monocytogenes</i> inoculada artificialmente em presunto suíno cozido e fatiado.....	62
Análise Estatística	71
Conclusão	71
Agradecimentos	71
Referencias.....	71

INTRODUÇÃO

A listeriose representa a segunda causa mais conhecida de infecções humanas fatais, ocasionada pelo consumo de alimentos contaminados e tem como agente etiológico a *Listeria monocytogenes* (WIEDMANN, 2002). A doença apresenta uma alta taxa de mortalidade e a mais elevada taxa de internação hospitalar entre todos os agentes patogênicos de origem alimentar (SILVA, 2007; ZHANG; JAYARAO; KNABEL, 2004). Estima-se que nos Estados Unidos anualmente 1.600 pessoas fiquem gravemente enfermas com listeriose e dessas 260 evoluam para óbito (CDC, 2008)

Comumente a população de *Listeria* em muitos produtos alimentícios é baixa ($<10^2$ UFC/g). Entretanto, produtos como presunto, mortadela, salame e outros, frequentemente são contaminados por microrganismos patogênicos resistentes ao sal e capazes de se multiplicar durante o armazenamento em refrigeração. Em se tratando da *L. monocytogenes*, o consumo desses alimentos por idosos, gestantes e indivíduos imunodeprimidos, pode ser potencialmente perigoso e levar a óbito (BEUMER; HAZELEGER, 2003; CAMARGO, 2011).

Devido à capacidade de *L. monocytogenes* se multiplicar durante o armazenamento refrigerado, podendo causar surtos de toxinfecção alimentar (WHO/FAO, 2004), a *Food and Drug Administration* (FDA) estabeleceu uma política de "tolerância zero" para esta espécie bacteriana em alimentos prontos para o consumo (WHO/FAO, 2004).

Adicionalmente, o *United State Department of Agriculture* (USDA-FSI) editou uma legislação para *L. monocytogenes* obrigando que todas as plantas processadoras de carnes prontas para o consumo apliquem tratamentos letais em seus produtos, podendo incluir o uso de antimicrobianos para inibir ou eliminar a presença de *L. monocytogenes* (UPADHYAY et al., 2013; USFSIS, 2004). No Brasil, a legislação vigente contempla apenas queijos de média e alta umidade, exigindo ausência do microrganismo em 25g do produto analisado (BRASIL, 2001).

O surgimento de bactérias patogênicas resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos disponíveis, associado à exigência dos consumidores por alimentos mais naturais, sem conservantes químicos e com longa vida útil, tornou-se um problema crítico para a indústria de alimentos moderna. Essa realidade veio abrir fronteiras para a aplicação de substâncias Geralmente Reconhecidas como Seguras (GRAS), como é o caso das

bacteriocinas, bacteriófagos, e ácidos orgânicos de cadeia curta (CARLTON et al., 2005; HAGENS, 2009; NASCIMENTO et al., 2008).

Atualmente, a aplicação de bacteriocinas como parte das tecnologias de barreiras tem ganhado atenção. Várias bacteriocinas mostram efeitos aditivos ou sinergismo quando usadas em combinação com outros antimicrobianos, incluindo preservativos químicos, compostos fenólicos naturais, assim como outras proteínas antimicrobianas. A efetividade de bacteriocinas é muitas vezes ditada pelos fatores ambientais como pH, temperatura, composição e estrutura do alimento, assim como a microbiota alimentícia (GÁLVEZ et al., 2007).

Os ácidos orgânicos de cadeia curta e seus sais podem potencializar a atividade de bacteriocinas, pois o aumento na carga livre das bacteriocinas a baixo pH pode facilitar a translocação das moléculas através da parede celular do microrganismo. A solubilidade das bacteriocinas pode também aumentar a baixo pH, facilitando a difusão das moléculas. Há um aumento da sensibilidade de *L. monocytogenes* à nisina (40UI/ml) quando em combinação com lactato de sódio (GROSULESCU et al. 2011; SCANELL et al.2000).

Estudos também demonstrado o efeito sinérgico do bacteriófago P100 combinado com nisina (LEVERENTZ et al., 2003).

Bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam bactérias; são específicos, ligam-se apenas aos seus hospedeiros, não afetando as bactérias desejadas nos alimentos. Carlton et al. (2005) patentearam o bacteriófago P100 e em 2006 a FDA aprovou o uso do mesmo para o controle de *L. monocytogenes* em alimentos. Representa um dos poucos fagos virulentos conhecidos para o gênero *Listeria*, que são estritamente líticos e, portanto, invariavelmente letal para uma infecção bacteriana celular quando a mesma é estabelecida.

O uso simultâneo de bacteriocinas com outros agentes antimicrobianos pode ser útil não apenas para diminuir a dose da bacteriocina adicionada, mas também para evitar um novo crescimento de células adaptadas ou resistentes à bacteriocina. Nesse contexto, emerge a necessidade de estudos que avaliem o potencial antimicrobiano desses agentes isolados e em combinação para redução de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo.

OBJETIVOS

GERAL

Investigar a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos cozidos e fatiados e avaliar o uso de antimicrobianos no controle da contaminação.

ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar a ocorrência de *L. monocytogenes* em amostras de presunto suíno cozido e fatiado;
- ✓ Investigar a ocorrência de *L. monocytogenes* em amostras de peito de peru cozido e fatiado;
- ✓ Identificar os sorotipos dos isolados de *Listeria spp*;
- ✓ Comparar a ação dos tratamentos com os antimicrobianos: bacteriocina nisina, bacteriófago P100 e lactato de sódio para controle da contaminação.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 *Listeria monocytogenes*

Bactérias do gênero *Listeria* possuem forma de bastonete curto, com diâmetro de 0,4 a 0,5 µm e comprimento de 0,51 a 2,0 µm, são Gram positivas, com ausência de capsula celular, e não formadoras de esporos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997; VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Atualmente, compreende oito espécies, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* (subespécies *ivanovii* e *londoniensis*) e *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, e mais *Listeria marthii* e *Listeria rocourtiae*. Destas somente duas espécies são reconhecidamente patogênicas a *L. ivanovii*, que apresenta patogenicidade restrita aos ruminantes, e *L. monocytogenes* capaz de infectar uma variedade de espécies animais, incluindo o homem (GOPAL et al., 2010; SWAMINATHAN, 2001; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Existe um total de 13 grupos sorológicos de *L. monocytogenes* (JAY, 2005; LEMES-MARQUES et al., 2007; RYSER; MARTH, 1999), que podem ser separados em três grupos (I, II e III), sendo os mais importantes o grupo I e II. Compõe o grupo I as cepas pertencentes aos sorotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e, os sorotipos do grupo II correspondem aos 1/2a, 3a, 1/2c e 3c (ILSI, 2005; WIEDMANN et al., 1997). Estudos clínicos propõem diferenças entre o potencial patogênico das respectivas linhagens, uma vez que os sorotipos da linhagem I estariam mais relacionados à doença em humanos, enquanto cepas da linhagem II são mais prevalentes em alimentos (ILSI, 2005; JEFFERS et al., 2001). Deste modo, a maioria dos casos de listeriose humana está associada aos sorotipos 4b, 1/2a e 1/2b (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007)

Embora a listeriose seja uma doença de baixa incidência (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007), é a segunda maior causa de patologia fatal decorrente de infecções alimentares (WIEDMANN, 2002). Trata-se de uma doença veiculada por alimento com elevada mortalidade, em torno de 20 a 30%, e a mais elevada taxa de internação hospitalar (90%) (SILVA, 2007; ZHANG; JAYARAO; KNABEL, 2004). De acordo com CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC, 2008) estima-se que no Estados Unidos anualmente 1.600 pessoas fiquem gravemente enfermas com listeriose e dessas 260 evoluam para óbito. São escassas as publicações sobre a incidência de listeriose no Brasil,

pois não se trata de uma doença de notificação obrigatória no país, sendo deste modo sub-relatada (BLUM-MENEZES, 2013; MARTINS, 2009).

Acredita-se que a maioria dos casos de listeriose humana tenham como mecanismo de veiculação da *L. monocytogenes* o alimento (HOFER; REIS; HOFER, 2006). A presença constante e assintomática da *Listeria* em animais os torna disseminadores da bactéria para o ambiente. Embora não pertença a microbiota normal de animais saudáveis ou homem, é uma bactéria que contamina ambiente e alimentos, geralmente, durante a fermentação, processamento, armazenamento, e até mesmo embalagens de alimentos. Essa contaminação inclui a maioria dos produtos prontos para consumo, como leite e queijos (principalmente o queijo de massa macia), frios (diferentes tipos de carnes), cachorros-quentes, mariscos e diversas guloseimas (BERSOT, 2004; CARLTON et al. 2005).

A *L. monocytogenes* é caracterizada como uma bactéria psicrotrófica, cresce em temperaturas que variam de 3 a 45°C, apresentando uma faixa ótima de crescimento entre 30 e 37°C, é capaz de resistir a sucessivos congelamentos e descongelamentos, como também a uma ampla faixa de pH, 4,4 a 9,6, com pH ótimo de crescimento de 7,0 (FRANCO; LANDGRAF, 2005; LOGUERCIO et al., 2001). Tolerante altas concentrações de sal (10%) e atividade de água de até 0,92 (HAIN et al., 2007; RYSER; MARTH, 2007). Possui característica de anaerobiose facultativa com metabolismo fermentativo, portanto se multiplica bem em ambientes com baixa quantidade de O₂ e aumento na tensão de CO₂, como no caso de alimentos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada (NILSSON et al., 2002). Associadas as características descritas, pode-se somar a capacidade que a *L. monocytogenes* possui de aderir às mais diferentes superfícies que entram em contato com o alimento (AUTIO et al., 2003).

Portanto, produtos cárneos prontos para consumo contaminados por *L. monocytogenes* são importantes fontes de listeriose humana, pois suportam a multiplicação da bactéria, apresentam uma longa vida de prateleira quando refrigerados e são frequentemente consumidos sem cozimento prévio (ILSI, 2005). Muitos surtos vêm sendo atribuídos a este grupo de alimentos na Europa e nos Estados Unidos (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

2 *Listeria monocytogenes* como agente etiológico da Listeriose

A *L. monocytogenes* é o principal agente causador da listeriose em humanos e animais; 98% e 85%, respectivamente (JAY, 2005). As espécies de *Listeria* são amplamente distribuídas na natureza podendo ter como fonte de contaminação solo, vegetais em decomposição, silagem, esgoto e água, (JAY, 2005; RYSER; MARTH, 2007). No geral, a incidência de casos de listeriose varia de 0,2-0,8 casos esporádicos/100.000 pessoas por ano na Europa e nos EUA (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Na Europa, a incidência de listeriose parece ter aumentado desde o ano de 2000, em especial, entre os indivíduos com mais de 65 anos de idade (ALLERBERGER; 2003; TODD; NOTERMANS, 2011). Na França, estes aumentos não puderam ser atribuídos a surtos de origem alimentar, e nenhum aumento foi observado em casos associados à gravidez. Os países europeus parecem estar passando por um aumento da incidência de listeriose entre pessoas acima dos 60 anos de idade. A causa deste aumento da incidência seletiva não é conhecida.

Silk et al. (2012) observaram que a incidência anual global de listeriose variou 0,25-0,32 casos por 100.000 habitantes entre 2004-2009. Entre as mulheres latino-americanas, a incidência de listeriose associada à gravidez aumentou 5,09-12 casos por 100.000 mulheres para os períodos de 2004-2006 e 2007-2009, respectivamente; entre as mulheres não-hispânicas, a listeriose associada à gravidez aumentou 1,74-2,80 casos por 100.000 mulheres para os mesmos períodos. As taxas de incidência de listeriose em pacientes com idade ≥ 65 anos foram 4-5 vezes maior do que as taxas globais anuais. Os dados demonstram que há um aumento no risco de listeriose entre os idosos, mulheres grávidas, e os hispânicos nos Estados Unidos (POUILLOT et al., 2012).

A manifestação clínica da doença é descrita de duas formas, invasiva e a gastrintestinal (não invasiva). A listeriose invasiva é uma doença severa, principalmente, para pessoas susceptíveis a adquirir a infecção, como gestantes, recém-nascidos, idosos, pacientes submetidos à hemodiálise, a terapias prolongadas e indivíduos com sistema imunológico comprometido (SWAMINATHAN, 2001). Em gestantes, a infecção é mais frequente no terceiro trimestre da gravidez, geralmente assintomática ou com sintomas parecidos com os da gripe; porém, para o feto ou recém-nascido as consequências são muito mais graves, incluindo parto prematuro, aborto, morte fetal, meningite e septicemia (COLODNER et al., 2003; SWAMINATHAN, 2001).

Em indivíduos suscetíveis, células viáveis de *L. monocytogenes* ingeridas com os alimentos contaminados podem atravessar a barreira intestinal e entrar na circulação do

organismo e infectar partes normalmente estéreis do corpo, tais como fígado, baço, fluido cerebral espinal e sangue; na ausência de uma adequada resposta imune, se propagam em órgãos-alvo, ou seja, sistema nervoso central e placenta (COSSART; TOLEDO-ARANA, 2008; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Em adultos saudáveis ocorrem principalmente diarreia e febre; em mulheres grávidas, febre, diarreia e aborto; em recém-nascidos, sepse, pneumonia ou meningite. Indivíduos com comprometimento do sistema imunológico tais como transplante, doença hepática, HIV/AIDS e diabetes; podem desenvolver sepse, meningite e infecções graves que afetam o sistema nervoso. Adultos aparentemente saudáveis, sem condição predisponente ainda podem ter meningite e bacteremia. A maioria dos casos confirmados de listeriose ocorrem em indivíduos com mais de 65 anos de idade, cuja taxa de letalidade pode variar de 20 a 30% (COLODNER et al., 2003; HOFER, 2001; TODD; NOTERMANS, 2011).

A invasão da *L. monocytogenes* nas células do homem é própria de microrganismo, que possui capacidade de invadir macrófagos e uma série de células não fagocíticas de diferentes órgãos e tecidos, como as dos hepatócitos e endoteliais. A invasão célula a célula permite a sua proliferação dentro dos tecidos hospedeiros e a formação de focos infecciosos, protegendo-se das defesas do hospedeiro. Motivo que pode justificar o fato dos anticorpos não exercerem papel importante na recuperação a partir de uma infecção, ou proteção contra infecções secundárias (CABANES et al., 2002).

O processo de infecção é característico em todas as células eucarióticas e é constituído por quatro fases distintas: 1) adesão e internalização dentro da célula hospedeira; 2) escape da vesícula fagocítica para dentro do citoplasma; 3) multiplicação e movimentação pelo citoplasma da célula hospedeira devido à polimerização; 4) formação da cauda de actina; e a passagem para as células adjacentes (ILSI, 2005). A invasão celular é decorrente da polimerização de filamentos de actina que direcionam a bactéria à célula adjacente, provocando a formação de invaginações e fagocitose, começando assim, um novo ciclo infeccioso (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

A listeriose não-invasiva pode causar infecções brandas, semelhantes a uma gripe, até surtos de gastroenterite febril em indivíduos saudáveis, mas normalmente não evolui para óbito, e, como uma gastroenterite febril, é caracterizada por febre, diarreia, cefaleia e dor muscular em indivíduos imunodeprimidos, com um período de incubação que pode variar de 11 horas a 1 semana. (HOFER, 2001).

No Brasil, Hofer, Reis e Hofer (2006) analisaram 255 amostras de *Listeria* isoladas de diferentes materiais clínicos, durante o período compreendido entre 1969 a 2000, e

concluíram que o sorovar 4b foi o mais incidente seguido pelo 1/2 a. O estudo evidenciou a circulação de *L. monocytogenes* na espécie humana, provocando quadros graves de meningite e septicemia, bem como, revelando a figura do portador assintomático, sugerindo uma deficiência na avaliação bacteriológica (HOFER; REIS; HOFER, 2006).

A quantidade de células viáveis de *L. monocytogenes* capazes de provocar o desenvolvimento da doença em humanos ainda não foi bem estabelecida, devido à impossibilidade de se realizar pesquisas com voluntários saudáveis, associada à dificuldade de encontrar a real contaminação dos alimentos envolvidos em surtos (BARANCELLI et al., 2011). A dose infectante relatada em casos de listeriose varia de 10^3 a 10^9 UFC/g ou mL, no entanto existem relatos de surtos com doses infectantes baixíssimas. Vale ressaltar que a dose infecciosa pode variar em função da virulência da cepa e da suscetibilidade do indivíduo. (DONELLY, 2001).

3 Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em Produtos Cárneos

De acordo com Hagens (2009) a contaminação de alimentos por *L. monocytogenes* não é causada apenas por procedimentos inadequados, trata-se de um patógeno resistente introduzido na maioria das fábricas e plantas de processamento de alimentos diariamente. Isto é explicado pelo fato de que a bactéria sobrevive às condições adversas, e até mesmo a mais rígida limpeza não assegura a sua remoção.

A *Listeria* pode estar presente em alimentos em baixas concentrações, não sendo suficiente para prejudicar a saúde humana, entretanto, se os alimentos são armazenados incorretamente pelo revendedor ou consumidor, a bactéria pode se multiplicar, o que é especialmente perigoso para a gestante, doentes e idosos (HAGENS, 2009).

Essa onipresença da *L. monocytogenes* no ambiente de processamento de alimentos deve-se a sua capacidade de formar biofilmes, com alta probabilidade de que as células aderidas permaneçam mesmo após higienização. Esta é uma das principais razões para a formação de biofilmes em superfícies em contato com os alimentos. Este risco é agravado em se tratando da *L. monocytogenes*, uma vez que esta bactéria tem a capacidade de aderir rapidamente ao aço inoxidável, sendo capaz de atingir um estágio de adesão irreversível em poucas horas (OLIVEIRA et al., 2010).

Vitas et al. (2004) investigaram a presença de *Listeria* spp. em um total de 3.685 amostras de alimentos obtidas no norte da Espanha. As amostras analisadas incluíram produtos crus (carne, leite e frango) e produtos processados (carne curada e cozida, vegetais

congelados e salmão defumado). A maior ocorrência de *Listeria* spp. foi encontrada em amostras de carne de frango crua (76,3%), seguida por amostras de carne moída bovina e suína (62,3%). Das 295 amostras de carne bovina e suína crua, 103 (34,9%) apresentaram-se contaminadas com *L. monocytogenes*, 103 (34,9%) com *L. innocua*, 45 (15,1%) com *L. welshimeri*, e 4 (1,6%) com *L. seeligeri*.

Mantilla et al. (2007) verificaram que de 30 amostras de carne moída crua comercializadas em Niterói-RJ, 15 (50%) apresentaram contaminação por *Listeria* spp., sendo duas (6,7%) positivas para *L. monocytogenes*.

Recentemente, Andrade et al. (2014) isolaram 26 cepas de *Listeria* spp. de salsichas do tipo *hot dog*, sendo 18 cepas de *L. innocua* e 08 cepas de *L. monocytogenes*. De 35 amostras de carne moída bovina crua, os autores isolaram 16 cepas de *Listeria* spp., sendo 12 cepas de *L. innocua* e 04 de *L. monocytogenes*.

Em trabalho conduzido por Rossi et al. (2009) foram analisadas 80 amostras de linguiças do tipo frescal comercializadas em Salvador, BA, sendo 40 de linguiça elaborada com carne suína e 40 com carne de frango. Os autores isolaram *Listeria* spp. em 12 amostras (15%), das quais três (3,75%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Entre as espécies, *L. innocua* foi isolada com maior frequência (13,75%); e em duas amostras foram detectadas as duas espécies. As cepas de *L. monocytogenes* isoladas pertenciam ao sorotipo 1/2a.

4 Ocorrência de *L. monocytogenes* em Produtos Cárneos Prontos Para Consumo

Apesar dos vários isolamentos relatados sobre os produtos cárneos crus, a maior preocupação quanto à presença de *L. monocytogenes* está relacionada aos alimentos prontos para o consumo. Embora atendam às exigências do mercado, por sua grande praticidade, produtos como presunto, mortadela, salame e outros são frequentemente contaminados por microrganismos patogênicos resistentes ao sal e capazes de se multiplicar durante armazenamento em refrigeração (CAMARGO, 2011). Muitos desses produtos são armazenados sobre refrigeração e consumidos sem tratamento térmico (BERSOT, 2008; MONTTIN, 2009) e a atmosfera modificada não inibe o crescimento de *L. monocytogenes* (HOELZER, POUILLOT; DENNIS, 2012).

Os principais alimentos envolvidos em surtos de listeriose são os produtos cárneos, frutos do mar prontos para consumo e os queijos pastosos, cujas características intrínsecas apresentam-se com alto teor proteico, moderada atividade de água e poucos microrganismos competidores (WARRINER; NAMVAR, 2009). Em 2008, Warner e Namvar relataram um

surto de listeriose causado pelo consumo de produtos cárneos fatiados, ocorrido no Canadá e resultando em 20 óbitos.

Nos países da Europa, em 2007, o alimento pronto para consumo com maior prevalência de *L. monocytogenes* (18,3%), e em nível superior a 100 UFC/g foi o peixe defumado (TODD; NOTERMANS, 2011). *L. monocytogenes* foi encontrada em vários produtos à base de carne: carne de porco, 2,2%; carne vermelha 2,5%; carne de frango prontas para consumo 3,0%, sendo que menos de 1% das amostras apresentaram contagens da bactéria superiores a 100 UFC/g (TODD; NOTERMANS, 2011).

No Brasil, vários relatos científicos demonstram a presença de *L. monocytogenes* em vários alimentos cárneos prontos para o consumo ((Tabela 1).

Tabela 1. Ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos fatiados prontos para consumo no Brasil.

Cidade (Estado)	Produto cárneo	<i>L. monocytogenes</i>		Referência
		N	%	
Rio de Janeiro (RJ)	Salame	6	13,3	Borges et al. (1999)
Fortaleza (CE)	Presunto	-	42,50	Fai (2011)
São Paulo (SP)	Salame	8	6,2	Martins (2009)
São Paulo (SP)	Presunto	1	0,8	Martins (2009)
Porto Alegre (RS)	Apresentado	7	-	Mottin (2008)
São Paulo (SP)	Salame	3	6,7	Sakate et al. (2003)

N = n° de amostras positivas

São poucos os estudos sobre ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos cozidos e fatiados no Brasil. Dos seis estudos sobre ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos fatiados prontos para consumo no Brasil, cinco foram conduzidos em cidades localizadas em estados da Região Sul e Sudeste (Tabela 1).

O produto mais estudado no Brasil foi o salame, seguido do presunto. A ocorrência da bactéria nos produtos foi muito variável, e o produto que apresentou maior variação nessa prevalência foi o presunto (0,8% a 42,50). Embora seja relatada uma ocorrência significativa de *Listeria* spp. em produtos cárneos prontos para consumo oriundo de matriz avícola, não foram encontrados estudos sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos derivados de peru, como é o caso do peito de peru defumado, cujo consumo vem aumentando consideravelmente no Brasil, como uma opção mais magra ao presunto suíno (TODD; NOTERMANS, 2011).

A etapa de fatiamento destes produtos aumenta o risco de contaminação devido a manipulação e ao contato com superfícies inadequadamente higienizadas. Galvez et al. (2007) ressaltam que a falta de microrganismos competidores, devido ao cozimento, favorece a multiplicação de microrganismos decorrente da contaminação pós-processamento. Além disso, o processo de fatiamento aumenta a superfície de contato de manipuladores e equipamentos. Há de se considerar que *L. monocytogenes* é uma bactéria com capacidade de formar biofilmes e de colonizar superfícies de equipamentos e utensílios. Esse microrganismo pode persistir por longos períodos em plantas de processamento de alimentos, sendo então capaz de contaminar o produto final (LAER et al., 2009)

Bersot et al. (2008) detectaram *L. monocytogenes* em todas as amostras de mortadela fatiada. Bersot et al. (2001), por sua vez, detectaram a bactéria em 26,7% das amostras de mortadela não fatiada. Estes resultados indicam que o fatiamento desempenha um papel crítico no processo de contaminação, ou seja, a embalagem a vácuo e a estocagem sob refrigeração não foram suficientes para o controle da multiplicação de *L. monocytogenes*.

Embora estudos demonstrem que a prevalência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos fatiados nos estabelecimentos de venda é maior que em produtos cárneos fatiados pelas indústrias, a concentração de *L. monocytogenes* nas amostras de produtos cárneos fatiados e embalados na indústria foi maior que a encontrada nos produtos manipulados nos próprios estabelecimentos de venda. Para os autores, o provável resultado deve-se a longa vida de prateleira dos produtos cárneos, quando fatiados pelas indústrias, permitindo que *L. monocytogenes*, quando presente, atinja populações mais elevadas uma vez que embalagens a vácuo não são suficientes para impedir o crescimento do microrganismo (GOMBAS et al., 2003).

Os ensaios de Galvez et al., 2007, Warriner; Namvar, 2009 também alertam para a capacidade de *L. monocytogenes* crescer até concentrações elevadas capazes de provocar surtos em produtos cárneos prontos para serem consumidos, até mesmo com uma contaminação inicial baixa.

Assim, o monitoramento da linha de processamento é essencial para o controle da contaminação de produtos cárneos por *L. monocytogenes* (TODD; NOTERMANS, 2011). Laer et al. (2009) traçaram a rota de contaminação de *L. monocytogenes* em uma linha de processamento de linguiça mista frescal, desde a matéria-prima até o produto final e *L. monocytogenes* foi detectada em 25% das amostras investigadas. Entretanto, não foi encontrado o patógeno em nenhuma amostra da matéria-prima, foi observado a ocorrência do microrganismo em 21% das amostras ambientais (com e sem contato com o alimento), 20,8%

dos equipamentos, 20% das amostras de mãos de manipuladores, 40% da massa pronta para ser embutida, e em todas as amostras do produto final. Isso demonstra que a contaminação do produto final ocorreu durante o processamento, alertando para a importância da contaminação cruzada. Ainda, segundo dados do trabalho, os perfis de macrorestrição mostraram que algumas cepas se adaptaram e persistiram no ambiente de processamento dessa indústria (LAER et al.,2009)

Os países em desenvolvimento raramente têm programas de vigilância para notificação e conhecimento dos casos de listeriose com base no pressuposto de que casos raramente são relatados. Entretanto, existem alguns programas de monitoramento para avaliar o nível de contaminação por *Listeria* de produtos alimentares (TODD; NOTERMANS, 2011).

Devido à capacidade de *L. monocytogenes* se multiplicar durante o armazenamento refrigerado, podendo causar surtos de toxinfecção alimentar (WHO/FAO, 2004), a *Food and Drug Administration* (FDA) estabeleceu uma política de "tolerância zero" para esta espécie bacteriana em alimentos prontos para o consumo (WHO/FAO, 2004).

Adicionalmente, o *United State Department of Agriculture* (USDA-FSI) editou uma legislação para *L. monocytogenes* obrigando que todas as plantas processadoras de carnes prontas para o consumo apliquem tratamentos letais em seus produtos, podendo incluir o uso de antimicrobianos para inibir ou eliminar a presença de *L. monocytogenes* (UPADHYAY et al., 2013; USFSIS, 2004). No Brasil, a legislação vigente contempla apenas queijos de média e alta umidade, exigindo ausência do microrganismo em 25g do produto analisado (BRASIL, 2001).

Na Grã Bretanha, foram determinados padrões para determinados alimentos prontos para consumo, determinando limites para cada tipo de alimento. Quando o microrganismo não é encontrada a presença do microrganismo em 25 g o alimento é considerado seguro. (JAY, 2005). Na Europa a legislação é rígida para leite e seus derivados determinando a política de “tolerância zero” para queijos de massa macia e ausência de *L. monocytogenes* em 1 g dos outros produtos.

A Instrução Normativa Nº 9, de 8 de abril de 2009, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instruiu os procedimentos de controle da *L. monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo, com o objetivo de monitorar e assegurar a inocuidade destes produtos em relação ao patógeno, e esses procedimentos se aplicam aos estabelecimentos que fabricam produtos de origem animal (BRASIL, 2009).

Os produtos cárneos prontos para consumo devem ser submetidos a análises periódicas nos laboratórios de referência, e em situação de contaminação o produto deve ser reprocessado, desde que o procedimento aplicado assegure a destruição do microrganismo. Após a etapa de reprocessamento, os estabelecimentos devem realizar análise microbiológica do produto para assegurar que o mesmo tenha ausência de *L. monocytogenes*. Não havendo possibilidade de reprocesso ou caso o reprocessamento realizado pelo estabelecimento fabricante de produtos de origem animal prontos para o consumo não tenha garantido a eliminação do microrganismo, os produtos devem ser inutilizados (BRASIL, 2009).

Apesar de inúmeros trabalhos evidenciarem os esforços de pesquisadores na busca de soluções para inibir o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em produtos cárneos fatiados, Luber et al. (2011) são de opinião que muitas pesquisas ainda são necessárias para aumentar o número e a variedade de opções tecnológicas para prevenção e controle de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo.

5 Uso da Tecnologia de Barreiras para controle de *L. monocytogenes* em alimentos

A multiplicação de um determinado microrganismos em alimentos é influenciada pela interação de fatores inerente aos alimentos, intrínsecos (atividade de água, pH, potencial redox, composição química, presença de antimicrobianos e microbiota presente) e do ambiente conhecido como fatores extrínsecos (temperatura, umidade, atmosfera). Nesse contexto, produtos cárneos cozidos possuem pH próximo da neutralidade (pH > 6,0), alta atividade de água (0,98 a 0,99), combinando, deste modo, diversas características que favorecem a multiplicação de bactérias patogênicas e/ou deteriorantes (GALVEZ et al., 2007). Deste modo o uso de aditivos e tecnologias que inibem o crescimento de bactérias pode significar uma melhora na qualidade do alimento (TOMPKIN, 2002).

Nos últimos anos, as tecnologias que utilizam métodos não térmicos de inativação de microrganismos vêm sendo bem descritos pela literatura, como sistemas de embalagens ativas, inteligentes ou com atmosfera modificada, utilização de compostos antimicrobianos naturais e bioconservação (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Deste modo, a segurança dos alimentos por meio de desestabilização dos microrganismos patogênicos e deteriorantes está normalmente relacionada com a combinação de diferentes tecnologias de conservação do produto, com o objetivo de assegurar a sua qualidade (THOMAS et al., 2008). O conceito de tecnologia de barreiras ou “hurdle technology” está associado a utilização de barreiras intencionalmente combinadas para evitar

o crescimento de microrganismos, este conceito foi desenvolvido inicialmente por Leistner (LEISTNER, 1987; LEISTNER; GORRIS, 1995; OCKERMAN; BASU, 2007).

5.1 Bacteriocinas

A biopreservação ou bioconservação está associada a utilização de compostos antimicrobianos considerados naturais de forma erradicar os agentes patogênicos de ocorrência em alimentos (OCKERMAN; BASU, 2007). As bacteriocinas têm aplicações na tecnologia de barreiras, sendo utilizadas para tratamentos combinados (de modo a terem um efeito sinérgico) e assim, possibilitar uma conservação de alimentos mais eficaz (CLEVELAND; MONTVILLE; CHIKINDAS, 2001).

A eficiência dos agentes antimicrobianos considerados como naturais depende de alguns fatores, como estado físico da matriz alimentar a qual será aplicado, capacidade de solubilizar em meio líquido, interação com os principais componentes do alimento (proteínas, carboidratos e lipídios), e alterações nas características sensoriais (sabor e textura). Deve ser considerado a possibilidade de surgirem bactérias resistentes ao composto antimicrobiano natural (DEVLIEGHIERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas biologicamente ativas sintetizadas nos ribossomos das células bacterianas e liberadas no meio extracelular, que apresentam ação bactericida ou bacteriostática, a depender do peso molecular, sobre microrganismos taxonomicamente relacionados. Além disso, não promovem alteração na qualidade sensorial do produto, observando-se o crescente interesse da indústria de alimentos sobre o potencial de utilização destes compostos em substituição aos conservantes químicos (NASCIMENTO; et al., 2008).

A atividade das bacteriocinas no alimento pode ser afetada por diversos fatores, como por exemplo: mudança na solubilidade e na carga eletrostática; ligação aos componentes do alimento; inativação por proteases; e mudanças na parede ou na membrana celular do microrganismo-alvo como resposta a fatores ambientais (GÄNZLE; WEBER; HAMMES, 1999).

A maior parte desses peptídeos bacterianos são resistentes a altas temperatura, sem comprometimento da atividade antimicrobiana (JOERGER et al., 1990). Porém, a eficiência das bacteriocinas depende do nível de contaminação do alimento pelo microrganismo alvo. Contaminações elevadas comprometem a atividade da bacteriocina, não impedindo o desenvolvimento do microrganismo deteriorante ou patogênico (RILLA et al., 2004).

As bacteriocinas possuem atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, estão distribuídas em quatro classes, Classe I ou lantibióticos, representados por pequenos peptídeos (19 a 38 resíduos de aminoácidos), termoestáveis, de baixo peso molecular (<5KDa), representado pela bacteriocina nisina; Classe II, pequenos peptídeos termoestáveis (<10KDa) divididos em três subclasses (IIa, IIb, IIc), geralmente apresentam estrutura helicoidal, permitindo sua inserção na membrana plasmática da célula alvo, promovendo despolarização da membrana e a morte celular. A classe IIa possui alta especificidade contra *L. monocytogenes*, promovendo a formação de poros na membrana da célula alvo e, conseqüentemente, morte celular. A classe IIb requer a atividade combinada de dois peptídeos para exercer a sua atividade; possui baixa atividade se forem empregados individualmente. As bacteriocinas da classe IIc apresentam união covalente entre as terminações N e C, resultando em uma estrutura cíclica. A classe III é formada por peptídeos termolábeis de alto peso molecular (>30kDa); são complexos quanto à atividade e a estrutura, promovem lise da parede celular da célula alvo e, finalmente, a classe IV é representada por grandes complexos de peptídeos com carboidratos e lipídeos em sua estrutura (CLEVELAND et al., 2001).

As bacteriocinas, de maneira geral, possuem três formas de aplicação. Em alimentos fermentados podem ser produzidas *in situ* pela adição de culturas lácticas bacteriocinogênicas no lugar das culturas tradicionais, pela adição dessas culturas como coadjuvante de outras já previstas no produto em questão, ou pela adição das bacteriocinas purificadas e liofilizadas diretamente nos alimentos (NASCIMENTO et al., 2008).

5.2 Bacteriófagos

Bacteriófagos são vírus que infectam bactérias e podem ser considerados como inimigos naturais das bactérias, conseqüentemente são fortes candidatos para bioconservação de alimentos. Os fagos exibem faixas estreitas com hospedeiro, normalmente segmentação por cepas específicas. É extremamente alta a especificidade dos fagos para um acolhimento distinto e isso se deve a cada passo no processo de reconhecimento, que requer compatibilidade nos sistemas de acolhimento (HAGENS, OFFERHAUS, 2008).

As principais vantagens no uso de bacteriófagos são: (i) especificidade, infectam apenas as células alvos, (ii) geralmente não cruzam espécies, (iii) são geralmente compostos i

de proteínas e ácidos nucleicos seus produtos de degradação consistem exclusivamente de aminoácidos e ácidos nucleicos. Assim, eles não são xenobióticos, e, ao contrário dos antibióticos e agentes anti-sépticos, a sua introdução e distribuição dentro de um dado ambiente pode ser visto como um processo natural (CARLTON et. al. 2005)

De acordo com Carlton et. al. (2005) os bacteriófagos são rotineiramente consumidos com a nossa comida, em números bastante significativos. Além disso, os fagos também são comensais normais de seres humanos e animais, e são especialmente abundantes no tracto gastrointestinal (CARLTON, 2005).

De acordo com Carlton et al. (2005), o bacteriófago P100 é um dos poucos fagos que podem ser utilizados para controle do gênero *Listeria*, com capacidade de provocar a morte do hospedeiro

A eficácia do uso de bacteriófagos no controle da *L. monocytogenes* nos mais variados tipos de alimentos vem sendo bem descrita (CARLTON et al.,2005; SONI, NANNAPANENI; HAGENS, 2009; LEVERENTZ et al., 2003).

No estudo conduzido por Leverentz et al. (2003) para avaliar a redução de *L. monocytogenes* em fatias de maçãs e melões pelo bacteriófago P100 e pela nisina (isolados e em combinação), o nível de redução da população da bactéria após o tratamento combinado foi significativamente melhor em relação aos tratamentos isolados.

Os bacteriófagos são considerados como aditivos e reconhecidos como seguros para o consumo – GRAS (*General Recognized as Safe*). Não contaminam o ambiente (HAGENS; OFFERHAUS, 2008).

5.3 Sais de ácidos orgânicos de cadeia curta

Dentre os bioconservadores de alimentos merecem destaque os ácidos orgânicos, por possuírem maior solubilidade, baixa interferência no sabor e baixo nível de toxicidade. Os ácidos orgânicos são comumente encontrados na natureza como componentes normais de tecidos animais e vegetais. São formados pela fermentação microbiana no trato intestinal, constituindo parte importante do suprimento energético dos animais hospedeiros. A atividade antimicrobiana dos ácidos fracos pode ser explicada por variados mecanismos, incluindo redução do pH, propriedades bacteriostáticas e diversas propriedades metabólicas aniônicas dos ácidos orgânicos após dissociação (BELLAVÉR; SCHEUERMANN, 2004).

A utilização dos sais de ácidos orgânicos vem sendo bem documentada (KNIGHT et al., 2007). Entretanto, poucas informações sobre o efeito da combinação dessas substâncias

com outros antimicrobianos na sobrevivência e crescimento de *L. monocytogenes*. A taxa de crescimento de *L. monocytogenes* em soluções contendo lactato de sódio depende principalmente da atividade de água do produto, temperatura de armazenamento e em menor extensão da quantidade de nitrito no produto (MBANDI; SHELEF, 2001).

São diversos mecanismos de ação propostos para o lactato de sódio, os mais aceitos são: o efeito bacteriostático em função da formação de ácidos lipofílicos de atividade fraca que atravessam a membrana se dissociam e acidificam o citosol da célula bacteriana. O outro mecanismo seria a capacidade do lactato de sódio diminuir a atividade de água do alimento (SCANNELL et al, 2000).

Scannell et al. (2000) combinaram lactato de sódio a 2% com bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* e conseguiram inibir *Clostridium perfringens* em linguiça fresca suína. A associação do lactato de sódio com diacetato de sódio proporcionou um efeito inibitório de *Salmonella* Enteritidis em carne bovina e queijos (MBANDI; SHELEF, 2000; SILVA, 2011).

Grosulesco et al. (2011) relataram que o efeito inibitório desse aditivo foi eficaz na inibição de *L. monocytogenes* em mortadela tipo *bologna*, sendo que a temperatura foi determinante para a eficácia do tratamento.

REFERÊNCIAS

- ALLERBERGER, F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 35, p. 183-189, 2003.
- ANDRADE, R. R. DE; SILVA P. H. C. DA; SOUZA N. R.; MURATA, L. S.; GONÇALVES, V. S. P.; SANTANA, A. P. Ocorrência e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. em salsichas tipo *hot dog* a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.1, p.147-152, 2014
- AUTIO, T.; KETO-TIMONEN, R.; LUNDÉN, J.; BJÖRKROTH, J. and KORKEALA, H. Characterization of Persistent and Sporadic *Listeria monocytogenes* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). **Systematic Applied Microbiology**, v.26, p. 539–545, 2003.
- BARANCELLI, G.V.; SILVA-CRUZ, J.V. PORTO, E.; OLIVEIRA, C.A.F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.78, n.1, p.155-168, 2011.
- BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte. **III Seminário Internacional de Aves e Suínos**, Florianópolis, SC, 2004.

BERSOT L.S., LANDGRAF M., FRANCO B.D.G.M., DESTRO M.T. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during process and storage conditions. **Meat Science** v.57, p.13–17, 2001.

BERSOT, L. A importância de *Listeria monocytogenes* para a saúde pública. In: **Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária**, 2004.

BERSOT, L. A importância de *Listeria monocytogenes* para a saúde pública. In: **Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária**, 2004.

BERSOT, L. S. S.; GILLIO, C.; TAVOLARO, T.; LANDGRAF, M.;FRANCO, B. D. G. ; DESTRO, M. T. Behaviour of *L. monocytogenes* in sliced, vacuum-packed mortadella. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 514-516, 2008

BEUMER, R. R.; HAZELEGER, W. C. *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. **Immunology Medical Microbiology**, v. 35, p. 191-197, 2003.

BLUM-MENEZES, D.; DELIBERALLI, I.; BITTENCOURT, N. C.; COUTO do, C. A. C.; BARBOSA, L. N.; SANTOS dos, A. M.; PINTO, G. G. Listeriosis in the far South of Brazil: neglected infection? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** V. 46, n. 3, p. 381-383, 2013.

BORGES, M. F.; SIQUEIRA, R. S.; BITTENCOURT, A. M.; VANETTI, M. C. D.; GOMIDE, L. A. M. **Occurrence of *listeria monocytogenes* in salami**. *Revista de Microbiologia*, v. 30, p. 362-364, 1999.

BRASIL. **Resolução - RDC No. 12, de 02 de janeiro de 2001**. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2009.

BRASIL. **Instrução normativa nº 9, de 8 de abril de 2009**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2009.

CABANES, D.; DEHOUX, P.; DUSSURGET, O.; FRAGEU, L.; COSSART, P. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, v.10, n.5, p.238-245, 2002.

CAMARGO, R. J. **Ação de bacteriocinas de bactérias lácticas no controle de *Listeria monocytogenes* e no aumento da vida de prateleira de mortadela fatiada**. 2011.94f. Tese (Programa de pós-graduação em ciências dos alimentos)-USP, São Paulo.

CARLTON, R. M.; NOORDMAN, W. H.; BISWAS, B.; MEESTER, E. D.; LOESSNER, M. J. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 43, p. 301-312, 2005.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy –Massachusetts, 2007. **Morbidity and Mortality Weekly Reports**, Atlanta, v. 57, n. 40, p.1097-1100, 2008.

CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J.; NES, I.F; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.

COLODNER, R.; SAKRAN, W.; MIRON, D.; TEITLER, N.; KHAVALEVSKY, E.; KOPELOWITZ, J.B. *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a nursery. **American Journal of Infectious Control**, v.31, n.5, p.322-324, 2003.

COSSART, P. Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. **International Journal Medical Microbiology**, v. 291, p. 401-409, 2002.

COSSART, P. & TOLEDO-ARANA, A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. **Microbes and Infection**, v. 10, p 1041- 1050, 2008.

DEVLIEGHIERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 14, p. 273-285, 2004.

DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition Reviews**, v. 59, p.183-194, 2001.

EBI Food Safety. FDA and USDA extend GRAS approval for LISTEX™ for all food products. News 2007, July, 2007. Disponível em: <http://www.ebifoodsafety.com/en/news-2007.aspx>. Acesso: Dezembro de 2013.

EVERIS, L.; BETTS. G. Evaluation of *Listeria* challenge testing protocols: A practical study using cooked sliced ham. **Food Control**, v.29, p. 61-65, 2013.

FAI, A. E. C.; FIGUEIREDO, E. A. T. DE; VERDIN, S. E. F.; PINHEIRO, N. M. DE S.; BRAGA, A. R. C.; STAMFORD, T. L. M. Salmonella sp e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Ciência saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2,p. 657-662, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

GALVEZ, A.; ABRIOUL, H.; LÓPEZ, R.L.; OMAR, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food microbiology** v.120, p 51-70,2007.
GÄNZLE, M. G.; WEBER, S.; HAMMES, W. P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 207-217, 1999.

GOMBAS, D. E.;CHEN, Y.;CLAVERO, R. S.; SCOTT, V. N. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Journal of Food Protection**, v..66, p. 559-569.2003.

GOPAL S. et al. Maltose and maltodextrin utilization by *Listeria monocytogenes* depend on an inducible ABC transporter which is repressed by glucose. **PLoSone**, v.5, n.4, 2010.

GROSULESCU, C.; JUNEJA, V. K.; RAVISHANKAR, S. Effects and interactions of sodium lactate, sodium diacetate, and pediocin on the thermal inactivation of starved *Listeria monocytogenes* on bologna. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 440-446, 2011.

HAGENS, S.; OFFERHAUS, M. L. Bacteriophages – New weapons for foods safety. **Food Technology**, v. 62, n. 4, p. 46-54, 2008.

HAGENS, S. A new era in the fight against *Listeria*. **Food Marketing & Tecnology**. v.23, n. 2, p 26-28, 2009.

HAIN, T.; CHATTERJEEA, S.S.; GHAIA, R.; KUENNEA, C.T.; BILLION, A.; STEINWEG, C.; DOMANN, E.; KÄRST, U.; JÄNSCH, L.; WEHLAND, J.; EISENREICH, W.; BACHER, A.; JOSEPH, B.; SCHÄR, J.; KREFT, J.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M.J.; DORSCHT, J.; NEUHAUS, K.; FUCHS, T. M.; SCHERER, S.; DOUMITH, M.; JACQUET, C.; MARTIN, P.; COSSART, P.; RUSNIOCK, C.; GLASER, P.; BUCHRIESER, C.; GOEBEL, W.; CHAKRABORTY, T. Pathogenomics of *Listeria* spp. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 541-557, 2007.

HOFER, E. Três decênios de experiência sobre *Listeria* no Brasil. In : MERCADANTE, A. Z.; BOBBIO, F.O; BOBBIO P. A.; PEREIRA, J. L., PASTORE, G.M. (Eds). **Ciência de Alimentos - avanços e perspectivas**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, vol. II, p.111-115, 2001.

HOFER, E.; REIS, F., C. M.; HOFER, C. B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba , v. 39, n. 1, p. 32-37, 2006 .

HOELZER, K.; POUILLOT, R. DENNIS, S. *Listeria monocytogenes* Growth Dynamics on Produce:A Review of the Available Data for Predictive Modeling. **Foodborne pathogens and disease**, v. 9,n. 7, 2012.

HUDSON, J. A.; BILLINGTON, C., CAREY-SMITH, G., GREENING, G. Bacteriophages as biocontrol agents in food. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 426-437, 2005.

ILSI RESEARCH FOUNDATION/RISK SCIENCE INSTITUTE, EXPERT PANEL ON *Listeria monocytogenes* IN FOODS. Achieving Continuous Improvement in Reductions in Foodborne Listeriosis—A Risk-Based Approach. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 9, p. 1932–1994, 2005.

JAY, J. M.; LOESSNER, M., GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. 7 ed, Springer, New York, USA. 2005.

JEFFERS, G.T.; BRUCE, J.L.; McDONOUGH, J.S.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis case. **Microbiology**, v.147, n.5, p.1095-1104, 2001.

JOERGER, M. C.,KLAENHAMMER, T. R. Cloning, expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J.J. **Bacteriology** v 172, p. 6339-47, 1990.

KNIGHT, T.D; CASTILLO, A. ; MAXIM, J. ; KEETON, J.T; MILLER, R.KEffectiveness of Potassium Lactate and Sodium Diacetate in Combination with Irradiation to Control *Listeria monocytogenes* on Frankfurters. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 1, p. 26–30.

LAER, A. E. V. et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in pelotas-rs by pfgc. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 574-582, 2009.

LEISTNER, L. Shelf stable products and intermediate moisture foods based on meats. In: ROCKLAND, L.B., BEUCHAT, L.R.(ed.), **Water activity: theory and application to foods**. New York:Marcel Dekker, 1987, p.295-327.

LEISTNER, L., GORRIS, L.G.M. Food preservation by hurdle technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 41-46, 1995

LEMES-MARQUES, E.G. et al. Pheno- and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from southwestern region of the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.2. p.287-292, 2007.

LEVERENTZ, B. CONWAY, W. S.; CAMP, M. J.; JANISIEWICZ, W. J.; ABULADZE, T.; YANG, M.; SAFTNER, R.; SULAKVELIDZE, A. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and bacteriocin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4519-4526, 2003.

LOGUERCIO, A. P.; SILVIA, W. P.; ALEIXO, J. A. G.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n. 80/81, p.39-48, 2001.

LUBER, P.; CREARAR, S.; DUFOR, C.; FARBER, J.; DATTA, A.; TODD, E.C.D; Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization e for improved prevention and control. **Food Control**, v. 22, n.9, p. 1535–1549, 2011.

MANTILLA S. P. S; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T. de. Santos E. B. Gouvêa, R.. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1225-1230, 2007

MARTINS, E. A. ***Listeria monocytogenes* em produtos fatiados do tipo read-to-eat, presunto cozido e salame, comercializados no município de São Paulo: Ocorrência, quantificação e sorotipagem.** São Paulo. 2009. 76p. Tese (Doutorado em Prática Saúde Pública) – Departamento de Prática de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MBANDI, E.; SHELEF, L. A. Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in meat by combinations of sodium lactate and diacetate. **Journal of Food Protection**, v.64, n.5, p. 640-4, 2001.

MONTEVILLE, T. J. AND MATHEWS, K. Food Microbiology: an introduction. ASM Press, **American Society for Microbiology**, 2005.

MOTTIN, V. D. **Avaliação microbiológica de apresetados, fatiados e comercializados em supermercados de porto Alegre, RS.** Porto Alegre, 2008.70p. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências básicas da saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do sul. 2008.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, L.; KUAYE, A, YOSHITERU. **Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. Brazilian Journal of. Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

NILSSON, L.; CHEN, Y.; CHIKINDAS, M. L.; HUSS, H. H.; GRAM, L.; MONTVILLE, T. J. Carbon Dioxide and Nisin Act Synergistically on *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 769–774, 2002.

OCKERMAN, H. W; BASU, L. Production and Consumption of Fermented Meat Products. In F. Toldrá (Ed.), **Handbook of Fermented Meat and Poultry** .Iowa, EUA: Blackwell. (2007).

OLIVEIRA, M. M. M. de et al . Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p.97-106, 2010.

PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, Noel R. K. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo, SP: Makron Books do Brasil: Pearson Education do Brasil, 1997.

POUILLOT, R.; HOELZER, K. JACKSON, K. A.; HENAO, O.; SILK, B. J. Relative Risk of Listeriosis in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) Sites According to Age, Pregnancy, and Ethnicity. **Clinical Infectious Diseases**, v.54p. 405–S410, 2012;

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of Chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie (LWT)**, v. 38, p. 859-865, 2005.

RILLA, N, Martinez, B., Rodrigues. A. Inhibition of a methicilin-resistant *Stapylococcus aureus* strain in Afuega Pitu cheese by the nisin Z producing strain *Lactococcus lactis*. **IPLA 729**, v. 67, n. 5, p. 928-933, 2004.

RODGERS, S. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures – A Review. **Trends in Food Science; Technology**, v. 12, p. 276-284, 2001.

ROSSI L. P.R., ALMEIDA, R. C.C., LOPES, L. S. , FIGUEIREDO A. C.L., RAMOS, M. P.P. Almeida, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in Brazilian fresh sausage and control of *Listeria monocytogenes* using bacteriophage P100. **Food Control**, v. 22, p. 954 – 958, 2009.

RYSER, E.T., MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, p. 738. 1999.

RYSER, E. T.; MARTH. E. H. Listeriosis in animals. In: _____ **Listeria, listeriosis, and food safety**. 3.ed. Boca Raton: Flórida, p.55-84, 2007.

SAKATE, R. I.; ARAGON, L. C.; RAGHIANTE, F.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M.;DESTRO, M. T. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. **Archivos latinoamericanos de nutricion**, v.53, n.2, 2003

SCANNELL, A. G. M.; ROSS, R. P.; HILL, C.; ARENDT, E. K. An effective lacticin biopreservative in fresh pork sausage. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 3, p.370-375, 2000.

SCHMID, M. W., NG, E. Y. W., LAMPIDIS, R., EMMERTH, M., WALCHER, M., KREFT, J., GOEBEL, W., WAGNER, M. AND SCHLEIFER, K-H. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 1 – 18, 2005.

SILK, B. J.; DATE, K. A.; JACKSON, K. A et al. Invasive Listeriosis in the Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004–2009: Further Targeted Prevention Needed for Higher-Risk Groups. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, p. 396–404, 2012.

SILVA, N. da. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ª ed. São Paulo: Varela, 2007. 536p.

SONI, K. A.; NANNAPANENI, R.; HAGENS, S. Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish filets by bacteriophage Listex P100. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.00, n. 00, p.1– 8. 2009.

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. Food microbiology, fundamentals and frontiers. 2nd ed., Washington D. C.: ASM, 2001. chap. 18, p. 383-409.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v.. 9, p. 1236–1243, 2007.

THOMAS, R.; ANJANEYULU, A. S.; KONDAIAH, N. Development of shelf stable pork sausages using hurdle technology and their quality at ambient temperature (37+/-1 degrees C) storage. **Meat Science**, v.79, p.1-12, 2008.

TODD, E.C.D.; NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 22, p. 1484-1490, 2011.

WARRINER, K.; NAMVAR, A. What is the hysteria with *Listeria*? **Trends in food science & Technology**, v.20, p. 245–254, 2009.

WHO/FAO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**. Technical report. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/en/> Acesso em: Dezembro 2013

WIEDMANN, M. Molecular Subtyping Methods for *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 2, 2002.

WIEDMANN, M. COLOCAR TODOS OS AUTORES. A. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. **Infection and Immunity**, v.65, , p.2707-2716, July 1997

TOMPKIN, R.B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, v.65, n.4, p.709-725, 2002.

UPADHYAY, A.; UPADHYAYA, I.; ANUP KOLLANOOR-JOHN, A.; BASKARAN, S.A.; KARUMATHILP, S.M.D.; VENKITANARAYANAN, K. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters by plant-derived antimicrobials alone or in combination with hydrogen peroxide. **Food Microbiology**, v. 163, p.114-8, n. 2013

USFIS, U.S. Food Safety and Inspection Service. **Compliance guidelines to control *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products.** 2004

VITAS, A. I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 349-356, 2004.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNALKREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Review**, v.14, p. 584-640, 2001.

VÁSQUEZ, S. M.; SUÁREZ, H.; ZAPATA, S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 36, n.1, p. 64-71, 2009.

ZHANG, W.; JAYARAO, B. D.M.; KNABEL, S. J. Multi-Virulence-Locus Sequence Typing of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 913-920, 2004

CAPÍTULO 2

Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos fatiados prontos para o consumo comercializados em supermercados de Salvador, BA.

Título resumido: *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos

Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products commercialized in supermarkets of Salvador, BA.

Running head: *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat

Ana Cláudia Leite Figueiredo¹, Rogeria Comastri de Castro Almeida^{2*}

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia. Rua Barão de Geremoabo, s/n, Ondina, Cep: 40.170-290, Salvador, BA, Brasil.

² Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia. Av. Araújo Pinho, n° 32, Canela, Cep: 40.110-160, Salvador, BA, Brazil

*Endereço para correspondência : R.C.C. Almeida, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

E-mail: rogeriac@ufba.br

Resumo

Produtos cárneos prontos para consumo contaminados por *Listeria monocytogenes* são importantes fontes de listeriose humana, pois suportam a multiplicação da bactéria e apresentam uma longa vida de prateleira. Deste modo, faz-se necessário estudos que contribuam com as informações sobre a contaminação por *L. monocytogenes* em produtos cárneos prontos para consumo, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias para controle deste patógeno nos respectivos produtos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de *L. monocytogenes* em presunto suíno e peito de peru fatiados. Um total de 90 amostras de presunto suíno e 90 amostras de peito de peru foram adquiridas em redes de supermercados de Salvador-BA e investigadas em relação à presença do patógeno. Foi observado uma incidência de *L. monocytogenes* em 2,2% das amostras de presunto e 3,3% das amostras de peito de peru. Os isolados pertenciam ao sorotipo 1/2a, sorotipo implicado nos surtos de listeriose. Apesar dos esforços verificados junto às indústrias de alimentos para erradicação da *L. monocytogenes* em produtos cárneos prontos para consumo, verifica-se ainda que é necessárias a adoção de métodos mais rigorosos para o controle de *L. monocytogenes* nesses produtos.

Palavras-Chaves: Segurança de alimentos, produtos cárneos prontos para consumo, *Listeria monocytogenes*.

Abstract

Ready-to-eat meat products contaminated with *Listeria monocytogenes* are important source of human listeriosis because support the multiplication of bacteria and have a long shelf life. Thus, it is necessary studies to increase the information on *L. monocytogenes* in ready-to-eat meat products, enabling the development of new strategies to control this pathogen in these products. The aim of this study was to evaluate the occurrence of *L. monocytogenes* in ready-to-eat sliced pork ham and sliced turkey breast . A total of 90 samples of pork ham and 90 samples of turkey breast were purchased in supermarket of Salvador, BA. The results demonstrate that 2.2% of sliced pork ham and 3.3% of sliced turkey breast were contaminate

with pathogen. The isolates belonged to serotype 1/2a, a serotype involved in listeriose outbreaks. Despite efforts to eradicate *L. monocytogenes* in ready-to-eat meat products by food industry, still is necessary the use of more rigorous methods to control the bacteria in these products.

Keywords: Food safety, ready-to-eat meat products, *Listeria monocytogenes*.

Introdução

Listeria monocytogenes é um dos principais patógenos de origem alimentar, responsável por causar listeriose em humanos e animais. Embora possua baixa incidência (Berrang et al. 2005; Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007), a listeriose representa a segunda maior causa de óbitos por infecções alimentares (Wiedmann, 2002), com alta taxa de mortalidade e a mais elevada taxa de internação hospitalar, entre todos os agentes patogênicos de origem alimentar (Silva 2007; Zhang et al., 2004).

De acordo com *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) estima-se que nos Estados Unidos anualmente 1.600 pessoas fiquem gravemente enfermas com listeriose e dessas 260 evoluam para óbito. No Brasil, por não se tratar de uma doença de notificação obrigatória, são escassas as investigações sobre a ocorrência de listeriose em humanos (Blum-Menezes 2013; Martins 2009).

É provável que a maioria dos casos humanos esporádicos de listeriose tenham como mecanismo de transmissão da *L. monocytogenes* os alimentos (Hofer et al. 2006). A presença constante e assintomática da *Listeria* em animais os torna disseminadores da bactéria para o ambiente. Embora não pertença à microbiota normal de animais saudáveis ou homem é uma bactéria que contamina ambiente e alimentos, geralmente durante a fermentação, processamento, armazenamento e até mesmo embalagens de alimentos. Isto inclui a maioria

dos produtos prontos para consumo, como leite e queijos (principalmente o queijo de massa macia), frios (diferentes tipos de carnes), cachorros-quentes, mariscos e diversas guloseimas (Bersot 2004; Carlton et al. 2005).

Produtos cárneos prontos para consumo contaminados por *L. monocytogenes* são importante fonte de listeriose humana, pois suportam a multiplicação da bactéria, apresentam uma longa vida de prateleira, quando refrigerados, e são frequentemente consumidos sem cozimento prévio (Ilsi,2005). Nesse contexto, diversos surtos foram atribuídos a este grupo de alimentos, na Inglaterra, França e muitos locais dos Estados Unidos (Swaminathan e Gerner-Smidt 2007; Todd e Notermans 2011).

Produtos cárneos prontos para consumo, como presunto, mortadela, salame e outros, frequentemente são contaminados por microrganismos patogênicos resistentes ao sal e capazes de se multiplicar durante o armazenamento em refrigeração. Por se tratar de um microrganismo com capacidade de crescimento durante a refrigeração a população de *L. monocytogenes* no alimento pode aumentar para $10^6 - 10^8$ UFC/g, e se consumido por idosos, gestantes e indivíduos imunodeprimidos, podem ser potencialmente letais (Beumer e Hazeleger 2003; Camargo 2011).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 2009, criou o programa de Controle de *L. monocytogenes* em Produtos de Origem Animal Prontos para Consumo, cujo objetivo consiste em instituir procedimentos de controle da bactéria nos respectivos produtos e tem como objetivo monitorar e assegurar a inocuidade dos mesmos em relação a este patógeno (Brasil, 2009).

Deste modo, faz-se necessário estudos que contribuam com informações sobre a presença de *L. monocytogenes* em produtos cárneos prontos para consumo, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias para controle deste patógeno nos respectivos produtos.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de *L. monocytogenes* em presunto suíno e peito de peru fatiados.

Materiais e Métodos

Amostragem e procedimentos laboratoriais

As amostras de peito de peru e presunto suíno fatiados de marcas comerciais e lotes distintos, foram adquiridas em supermercados de Salvador-BA, no período compreendido entre fevereiro e dezembro de 2014, não foram inclusos produtos nas versões light e defumada. Foram coletadas 180 amostras no total, sendo 90 de peito de peru e 90 de presunto suíno fatiado, em porções aproximadas de 100g, obtidas em condições semelhantes à de consumo, e transportadas até ao laboratório em uma caixa isotérmica com gelo reciclado.

Investigação de *Listeria monocytogenes* em presunto e peito de peru fatiados

Para isolamento de *L. monocytogenes* foi seguida a metodologia descrita pela *International Standard* da ISO 11290-1. 25 g de cada amostra foram pesadas em capela de fluxo laminar (Labconco Corporation, Labconco Purifier classe Iib, escape total, modelo 36210-04, certificada ISO 9002, Kansas City, MO, EUA) e homogeneizada em 225 ml de caldo de enriquecimento primário (caldo Fraser em ½ concentração) (Merck, São Paulo, SP, Brasil), em stomacher (240 bpm; modelo ITR 1204, série 126, São Paulo, SP, Brasil) por 120 segundos e seguiu-se a incubação do homogeneizado a 30°C por 24 h. Posteriormente, 0,1 mL do caldo foi transferido para 10 mL do meio de enriquecimento secundário, caldo Fraser (Merck, São Paulo, SP, Brasil). Dos tubos que demonstraram escurecimento, uma alíquota de

0,1 ml foi adicionada à superfície do ágar ALOA Listeria (Biomérieux, São Paulo, Brasil), e as placas foram incubadas a 37°C por um período de 24- 48h (Ottaviani et al. 1997). Após essa etapa, 3-5 colônias características (azuis, de diâmetro inferior a 3 mm, com halo opaco) foram selecionados para confirmação.

Para confirmação de *L. monocytogenes* foram realizados os testes da catalase, Gram, motilidade em SIM (Difco, Detroit, MI, EUA), atividade hemolítica em ágar sangue de carneiro (Columbia Agar suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado, Himedia, São Paulo, SP, Brasil), e teste de fermentação de carboidratos (Seeliger e Jones 1986; Pagotto et al. 2001).

Uma cepa de referência *L. monocytogenes* Scott A (sorotipo 4b), ATCC 15313, foi usada para controle positivo.

Serotipagem

Para a sorotipagem, foram usados os antissoros somático policlonal e flagellar como descrito por Seeliger e Höhne (1979).

Confirmação das cepas isoladas por PCR Multiplex

Os isolados de *L. monocytogenes* foram estocados em caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Difco, Detroit, MI, USA) com 10% de glicerol estéril a -80°C. Posteriormente, os isolados foram recuperados por inoculação por estrias na superfície de placas com ágar BHI e foram então incubados “overnight” a 37°C. As células foram colhidas e suspensas em 500 µL de 1 x Tris-EDTA, agitadas em vortex e levadas a ebulição por 10 min. As amostras foram centrifugadas, e o sobrenadante foi distribuído em tubos de microcentrifuga. As amostras foram então estocadas a -20°C até o uso. As condições da PCR multiplex e os

iniciadores utilizados são sumarizados na Tabela 1. Os fragmentos amplificados foram sujeitos a eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com solução de brometo de ethidium (10 mg/mL) (Sigma, São Paulo, Brazil) e visualizados em um transiluminador UV acoplado a um sistema digital de imagem (Kodak EDAS 290). Cepas padrões de *L. monocytogenes*, ou ATCC 19115 (sorotipo 4b), ATCC 19111 (sorotipo 1/2a), ATCC 19112 (sorotipo 1/2c) e CDC F4976 (sorotipo 1/2b), foram usadas como controle positivo e *L. innocua* ATCC 12612 foi usada como controle negativo.

Tabela 1. Iniciadores, tamanho dos amplicons e condições de amplificação na análise de PCR para marcadores genéticos investigados no estudo

Primers	Sequência (5'-3')	Determinante	Amplicons	Amplification conditions	Referência
23S rRNA	F = GGGGAACCCACTATCTTTAGTC R = GGGCCTTTCCAGACCGCTTCA	Gênero <i>Listeria</i>	239 pb	95°C (1min.), 62°C (1min.), 72°C (1min.)	Hudson et al. 2001
D1	F= CGATATTTTATCTACTTTGTCA R= TTGCTCCAAAGCAGGGCAT	Divisão I ou III	214 pb	95°C (30sec.), 56°C (30sec.), 72°C (1min.)	Borucki e Call. 2003
D2	F = GCGGAGAAAGCTATCGCA R = TTGTTCAAACATAGGGCTA	Divisão II	140 pb	95°C (30sec.), 56°C (30sec.), 72°C (1min.)	Borucki e Call. 2003
ORF2110	F = AGTGGACAATTGATTGGTGAA R = CATCCATCCCTTACTTTGGAC	Sorotipo 4b	597pb	95°C (1min.), 60°C (1min.), 72°C (1min.)	Doumith et al. 2004
<i>lmo0737</i>	F= AGGGCTTCAAGGACTTACCC R= ACGATTTCTGCTTGCCATTC	<i>L. monocytogenes</i> sorovares 1/2a, 1/2c, 3a e 3c	691pb	95°C (1min.), 60°C (1min.), 72°C(1min.)	Doumith et al. 2004
<i>lmo1118</i>	F=AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R= CGGCTTGTTTCGGCATACTTA	<i>L. monocytogenes</i> sorovares 1/2c e 3c	906 pb	95°C (1min.), 60°C (1min.), 72°C(1min.)	Doumith et al. 2004
ORF2819	F=AGCAAAATGCCAAAACCTCGT R= CATCACTAAAGCCTCCCATTG	<i>L. monocytogenes</i> sorovares 1/2b, 3b, 4b, 4d, e 4e	471pb	95°C (1min.), 60°C (1min.), 72°C(1min.)	Doumith et al. 2004
<i>hly</i>	F = GCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAATC R = CTTGCAACTGCTCTTTAGTAACAGC	Listeriolisina O	706 pb	95°C(1min.), 62°C (1min.), 72°C(1min.)	Hudson et al. 2001

Resultados e Discussão

Foram isoladas inicialmente um total de 73 colônias características, provenientes de 39 amostras, sendo que destas 19 foram originadas das amostras de presunto suíno e 20 de peito de peru.

Após as provas de caracterização fenotípicas e bioquímicas um total 10 (5,6%) amostras foram positivas para *Listeria monocytogenes*, sendo 6 (6,6%) de presunto suíno fatiado e 4 (4,4%) de peito de peru fatiado. Entretanto, após a etapa de confirmação foram confirmadas 2 amostras positivas para *L. monocytogenes* e 4 positivas para *L. innocua* em presunto suíno e 3 amostras positivas para *L. monocytogenes* e 1 amostra positiva para *Ivanovii*. Os resultados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2. Isolamento de *Listeria* spp. de produtos cárneos fatiados prontos para o consumo em Salvador-Ba entre fevereiro e dezembro de 2014.

Isolado	Alimento	Espécie de <i>Listeria</i>	Sorotipo
A6	Peito de Peru	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a
A14	Peito de Peru	<i>L. innocua</i>	6a
A21	Peito de Peru	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a
A58	Peito de Peru	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a
B3	Presunto suíno	<i>L. innocua</i>	6a
B4	Presunto suíno	<i>L. innocua</i>	6a
B6	Presunto suíno	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a
B21	Presunto suíno	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a
B43	Presunto suíno	<i>L. innocua</i>	6a
B54	Presunto suíno	<i>L. innocua</i>	6a

Os cinco isolados obtidos no estudo foram identificados como *L. monocytogenes* pertencente ao sorotipo 1/2a. A análise de PCR multiplex com alvo no gene listeriolisina O (*hly*) da *L. monocytogenes* recuperada dos produtos cárneos, confirmou a potencialidade da virulência dos isolados.

Os resultados do presente estudo são semelhantes aos encontrados por Martins e Germano (2011) que verificaram uma incidência de *L. monocytogenes* igual a 0,8% e de *Listeria spp*, 1,5% em presunto suíno. De acordo com os autores, o resultado é um indicador da eficácia do tratamento térmico e das boas práticas de controle ambiental adotada pela indústria durante o manuseio do produto após o cozimento. Vale ressaltar que os autores não trabalharam com amostras fatiadas para comercialização. Os autores ressaltaram que a frequência da contaminação por *L. monocytogenes* foi equivalente entre presunto suíno e salame quando comparados ao tempo de vida útil. No entanto, independentemente do período de vida útil o salame mostrou diferenças significativas quanto à presença de *L. monocytogenes*, quando comparado com as amostras de presunto (Martins e Germano, 2011).

Em estudo recente conduzido por Fai et al. (2013) cujo objetivo foi avaliar a ocorrência de *Listeria spp*. em presunto suíno cozido sem capa de gordura, mantido sob temperatura de refrigeração, comercializado em supermercados de Fortaleza (CE), os autores encontraram índice de isolamento de *L. monocytogenes* bem superior ao do presente estudo, ou seja, 42,50%.

Mottin (2008) em Porto Alegre observou que dos produtos cárneos investigados denominados apresuntados, pertencentes a três estabelecimentos comerciais, todos apresentaram amostras positivas para *L. monocytogenes* (A=4%; B=2%; C=1%).

Aragon-Alegro et al. (2008) verificaram que de um total de 120 amostras de presunto suíno fatiado, carne moída e salsicha, *Listeria spp*. foi encontrada em 26 (65,0%) amostras de presunto cozido fatiado, 39 (97,5%) de carne moída e 16 (40,0%) de salsicha, segundo os

autores, o maior percentual de isolamento de *L. monocytogenes* e outras espécies, como *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* foram encontradas em presunto fatiado e carne moída.

Sakate et al., (2003) isolaram *L. monocytogenes* de salames fatiados pertencente ao sorotipo 1/2a, semelhante ao sorotipo isolado no presente estudo. Kovacevic et al. (2013) também investigaram a ocorrência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo a base de peixe e carnes vermelhas, no varejo de Vancouver, British Columbia (BC) e encontraram 5% das amostras de peixe contaminadas com a bactéria, os isolados pertenciam aos sorotipos 1/2a e 1/2b.

No estudo conduzido por Jamali et al. (2013) cujos objetivos foram determinar a prevalência de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo, os autores verificaram que das 396 amostras de alimentos analisadas, *Listeria* spp. foi detectada em 71 (17,9%) , sendo que destas 45 (11,4%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Entre os alimentos estudados as saladas e legumes tiveram a maior prevalência (14,7%), seguidos dos produtos de frango (13,2%), bebidas (10%), ovos e produtos de ovos (9,5%), carne bovina (6,7%) e de frutos do mar (6,7%).

Embora alimentos crus tenham apresentado maior incidência de contaminação por *L. monocytogenes* (Mantila et al., 2007; Vitas et al., 2007) com considerável crescimento da contaminação em vegetais (Jamali et al., 2013). Os produtos cárneos prontos para consumo ainda despertam elevada preocupação por serem consumidos sem tratamento prévio, como também por serem fonte de contaminação para o local de comercialização, principalmente quando fatiados.

Acredita-se que um dos motivos da baixa incidência de *L. monocytogenes* nos produtos estudados esteja associado à baixa quantidade de gordura, considerando que o acúmulo de gordura pode favorecer a propagação e proteger as células de *Listeria* (Martins e Germano 2011).

A baixa incidência do patógeno nos alimentos estudados, pode ser resultante do cumprimento a Instrução Normativa Nº 9, de 8 de abril de 2009, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que visa assegurar a ausência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos prontos para consumo. De acordo com a respectiva instrução normativa, produtos cárneos prontos para consumo devem ser submetidos a análises periódicas nos laboratórios de referência, e em situação de contaminação o produto deve ser reprocessado, desde que o procedimento aplicado assegure a destruição do microrganismo (BRASIL, 2009).

Durante o processo de aquisição dos produtos, foi observado que em muitos dos estabelecimentos que comercializam presunto suíno e peito de peru, os fatiadores eram específicos para cada produto, fator considerado positivo, uma vez que evita a ocorrência de contaminação cruzada na etapa de fatiamento.

Estudos sugerem que máquinas de corte são importantes meios de veiculação de *listeria monocytogenes*, com alto risco de exposição associado com o consumo das primeiras fatias processadas em um fatiador de frios contaminado. Essa premissa é baseada no fato de que foram detectados maiores contagens de *L. monocytogenes* (20 e 1900 UFC/g) nas fases iniciais da vida de prateleira, enquanto que as amostras que foram positivas para *L. monocytogenes* em fases tardias da vida de prateleira tiveram contagem de <10 UFC/g (Martins e Germano, 2011).

Para minimizar esse risco, são necessárias rigorosas práticas de higiene e controle (Martins e Germano, 2011). Deste modo, sugere-se que a manipulação e fatiamento de produtos constituem um ponto adicional de contaminação dos alimentos, devendo ser otimizados os protocolos de higienização nesses setores do comércio para aumentar a segurança dos produtos processados (Mottin, 2008).

Alguns autores tem relatado isolamento de *L. monocytogenes* de produtos cárneos; salames fatiados (Sakate et al., 2003; Borges et al., 1999), salsichas do tipo hot dog (Andrade

et al., 2014), carne moída (Andrade et al., 2014) no Brasil. Entretanto, ainda são poucos os estudos no Brasil e na América do Sul sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* em embutidos cárneos fermentados, fatiados, embalados a vácuo.

Devido as características de produção e armazenamento, produtos cárneos prontos para consumo são veiculadores potenciais de *Listeria monocytogenes* ao ser humano, principalmente a indivíduos imunodeprimidos, idosos e grávidas, levando a disfunções gastrintestinais e neurológicas, e até mesmo ao óbito (Sakate et al., 2003).

A presença da contaminação por *L. monocytogenes* demonstra a necessidade de estudos em nível nacional, da presença desta bactéria em produtos cárneos prontos para consumo. Por conseguinte auxiliar os órgãos governamentais de fiscalização a adotarem níveis máximos permitidos de *L. monocytogenes* nestes alimentos, e as indústrias e comércio a implementarem medidas de controle higiênico-sanitário como as Boas Práticas de Fabricação e sistemas como o Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle , garantindo, assim, um produto seguro para a saúde do consumidor.

Conclusão

A ocorrência de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a nos alimentos investigados é um dado preocupante e indica que apesar dos esforços para erradicação da *L. monocytogenes* em produtos cárneos fatiados prontos para consumo, ainda são necessárias medidas mais rigorosas para o controle da contaminação. Os estudos publicados na literatura concomitantemente com os resultados obtidos no presente estudo demonstram que mesmo com os esforços dos órgãos responsáveis por fiscalizar produtos cárneos prontos para consumo a erradicação da *L. monocytogenes*, ainda é um desafio.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia pela bolsa de estudos concedida, e ao Instituto Oswaldo Cruz, nas pessoas do Dr. Hoffer e Dra. Dayse Vallin, pela sorotipagem e ensaio de PCR das cepas isoladas.

Referências

Andrade, R. R.; Silva P. H. C.; Souza, N. R.; Murata, L. S.; Gonçalves, V. S. P.; Santana, A. P. Ocorrência e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. em salsichas tipo *hot dog* a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal. *Ciência Rural*, v.44, n.1, p.147-152, 2014.

Aragon-Alegro, L. C.; Aragon, D. C.; Martinez, E. Z.; Landgraf, M.; Franco, B. D. G. De M.; Destro, M. T. Performance of a chromogenic medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* in food. *Food Control*, n.19, p.483–486, 2008.

Benetti, T. M.; Monteiro, C. L. B.; Beux, M. R.; Abrahão, W. M. Comparison of selective agars recommended by method ISO 11290-1 and chromogenic agars for the isolation of *Listeria* sp. in refrigerated sausages. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 48, n. 4, 2012.

Berrang, M.E.; Meinersmann R.J.; Frank, J.F.; Smith D.P.; Genzlinger L.L. Distribution of *Listeria monocytogenes* subtypes within a poultry further processing plant. *Journal of Food Protection*, v.68, p. 980-985, 2005.

Bersot L.S., Landgraf M., Franco B.D.G.M., Destro M.T. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during process and storage conditions. *Meat Science* v.57, p.13–17, 2001.

Bersot, L. A importância de *Listeria monocytogenes* para a saúde pública. In: Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária, 2004.

Bersot, L. S. S.; Gillio, C.; Tavoraro, T.; Landgraf, M.; Franco, B. D. G. ; Destro, M. T. Behaviour of *L. monocytogenes* in sliced, vacuum-packed mortadella. Brazilian Journal of Microbiology, v. 39, p. 514-516, 2008.

Beumer, R. R.; Hazeleger, W. C. *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. Immunology Medical Microbiology, v. 35, p. 191-197, 2003.

Blum-Menezes, D.; Deliberalli, I.; Bittencourt, N. C.; Couto, C. A. C.; Barbosa, L. N.; Santos, A. M.; Pinto, G. G. Listeriosis in the far South of Brazil: neglected infection? Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 46, n. 3, p. 381-383, 2013.

Borges, M. F.; Siqueira, R. S.; Bittencourt, A. M.; Vanetti, M. C. D.; Gomide, L. A. M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. Revista de Microbiologia, v. 30, p. 362-364, 1999.

Brasil. Resolução da diretoria colegiada- RDC no. 12, de 02 de janeiro de 2001. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Brasil. Instrução normativa nº 9, de 8 de abril de 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2009

Breed, R. S.; Murray, E. G. D. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore: The William and Wilkins Co. 1948.

Camargo, R. J. Ação de bacteriocinas de bactérias lácticas no controle de *Listeria monocytogenes* e no aumento da vida de prateleira de mortadela fatiada. 2011.94f. Tese (Programa de pós-graduação em Ciências dos Alimentos) -USP, São Paulo.

Carlton, R. M.; Noordman, W. H.; Biswas, B.; Meester, E. D.; Loessner, M. J. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 43, p. 301-312, 2005.

Centers for Diseases Control and Prevention. Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy –Massachusetts, 2007. *Morbidity and Mortality Weekly Reports*, Atlanta, v. 57, n. 40, p.1097-1100, 2008.

Fai, A. E. C.; Figueiredo, E. A. T. de; Verdin, S. E. F.; Pinheiro, N. M. de S.; Braga, A. R. C.; Stamford, T. L. M. *Salmonella sp e Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. *Ciênc. saúde coletiva*, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 657-662, 2011.

International Standard ISO-11290-1:1996 and 11290-2:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs and Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*.

Hofer, E.; Reis, F., C. M.; Hofer, C. B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba , v. 39, n. 1, p. 32-37, 2006

ILSI RESEARCH FOUNDATION/RISK SCIENCE INSTITUTE, EXPERT PANEL ON *Listeria monocytogenes* IN FOODS. Achieving Continuous Improvement in Reductions in Foodborne Listeriosis—A Risk-Based Approach. *Journal of Food Protection*, v. 68, n. 9, p. 1932–1994, 2005.

Jamali, H. ; Ching, L. C.; Thong, K. L. Detection and isolation of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media. *Food Control*, v. 32, p.19-24, 2013.

Jay, J. M.; Loessner, M., Golden, D.A. Modern Food Microbiology. 7 ed, Springer, New York, USA. 2005.

Kovacevic, J.; Mesak, L. R.; Allen, K. J. Occurrence and characterization of *Listeria* spp. in ready-to-eat retail foods from Vancouver, British Columbia. Food Microbiology, v. 30, p. 372-378, 2012.

Mantilla S. P. S; Franco, R. M.; Oliveira, L. A. T. de. Santos E. B. Gouvêa, R. Ciência Agrotécnica, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1225-1230, 2007

Martins, E. A. *Listeria monocytogenes* em produtos fatiados do tipo read-to-eat, presunto cozido e salame, comercializados no município de São Paulo: Ocorrência, quantificação e sorotipagem. São Paulo. 2009. 76p. Tese (Doutor em Prática Saúde Pública) – Departamento de Prática de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Martins, E. A.; Germano, P. M. L.. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. Food Control, v. 22, p. 297-302, 2011.

Mottin, V. D. Avaliação microbiológica de apresuntados, fatiados e comercializados em supermercados de Porto Alegre, RS. Porto Alegre, 2008. 70p. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do sul. 2008.

Ottaviani F., Ottaviani M., Agosti M. Esperienza su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. Industrie Alimentari, v. 36, p. 1-3, 1997.

Sakate, R. I.; Aragon, L. C.; Raghianti, F.; Landgraf, M.; Franco, B. D. G. M.; Destro, M. T. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. Archivos latinoamericanos de nutricion, v.53, n.2, 2003

Seeliger, H. P. R.; Jones, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A. (Ed). Bergey's manual of systematic bacteriology. 9.ed. Baltimore, USA: WilliansWilkins, v. 2, p.1235-1245, 1986.

Silva, E. G. N. Eficácia do Bacteriófago P100 e sais de ácidos orgânicos no controle da contaminação por *Listeria monocytogenes* inoculada artificialmente em queijos. 2011. 129f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

Silva, N. da. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3ª ed. São Paulo: Varela, 2007. 536p.

Swaminathan, B. *Listeria monocytogenes*. Food microbiology, Fundamentals and Frontiers. 2nd ed., Washington D. C.: ASM, 2001. chap. 18, p. 383-409.

Swaminathan, B.; Gerner-Smidt, P.; The epidemiology of human listeriosis. Microbes and Infection, v. 9, p. 1236–1243, 2007.

Warriner, K.; Namvar, A. What is the hysteria with *Listeria*? Trends in Food Science & Technology, v.20, p. 245–254, 2009.

Wiedmann, M. Molecular Subtyping Methods for *Listeria monocytogenes*. Journal of AOAC International, v. 85, n. 2, 2002.

WHO/FAO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Technical report. Disponível em:

<http://www.who.int/foodsafety/en/> Acesso em: Dezembro 2013

Todd, E.C.D. ; Notermans, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. Food Control, v. 22, p. 1484-1490, 2011.

Upadhyay, A.; Upadhyaya, I.; Anup Kollanoor-Johny, A.; Baskaran, S.A.; Karumathilp, S.M.D.; Venkitanarayanan, K. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters by

plant-derived antimicrobials alone or in combination with hydrogen peroxide. *Food Microbiology*, v. 163, p.114-8, n. 2013

USFIS, U.S. Food Safety and Inspection Service. Compliance guidelines to control *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products. 2004

Vázquez-Boland, J. A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Dominguez-Bernalkreft, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Review*, v.14, p. 584-640, 2001.

Vásquez, S. M.; Suárez, H.; Zapata, S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas em la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, v. 36, n.1, p. 64-71, 2009.

Vitas, A. I.; Aguado, V.; Garcia-jalon, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, v. 90, p. 349-356, 2004.

Zhang, W.; Jayarao, B. D.M.; Knabel, S. J. Multi-Virulence-Locus Sequence Typing of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 2, p. 913–920, 2004.

CAPÍTULO 3

Eficácia de antimicrobianos na redução da contaminação por *Listeria monocytogenes* inoculada em presunto suíno.

Título resumido: Controle de *Listeria monocytogenes* com antimicrobianos

Efficacy of antimicrobials in the control of *Listeria monocytogenes* inoculated in sliced ham.

Running head: Control of *Listeria monocytogenes* using antimicrobials.

Ana Cláudia Leite Figueiredo¹, Rogeria Comastri de Castro Almeida^{2*}

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia. Rua Barão de Geremoabo, s/n, Ondina, Cep: 40.170-290, Salvador, BA, Brasil.

² Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia. Av. Araújo Pinho, n° 32, Canela, Cep: 40.110-160, Salvador, BA, Brazil

*Endereço para correspondência: R.C.C. Almeida, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

E-mail: rogeriac@ufba.br

Resumo

O surgimento de cepas resistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis para o controle da bactéria, associado à exigência dos consumidores por alimentos mais naturais, sem conservantes químicos e com longa vida útil, tornou-se um problema crítico para a indústria de alimentos. Deste modo, faz-se necessário estudos que contribuam com as informações sobre a contaminação por *L. monocytogenes* em produtos cárneos prontos para consumo e o desenvolvimento de novas estratégias para controle do patógeno. O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de antimicrobianos no controle da contaminação utilizando o bacteriófago P100, nisina e lactato de sódio, em separado e em combinação. Para tal, porções individuais das amostras de presunto suíno foram submetidas ao tratamento e posteriormente contaminadas com *L. monocytogenes* 1/2^a, isolada anteriormente do presunto suíno, combinada com a cepa Scott-A (4b) na proporção 1:1 e submetidas por 15 min aos tratamentos. Verificou-se uma adesão aproximada de 10³ células/mL do microrganismo no produto. O tratamento com o bacteriófago P100 levou à completa erradicação da bactéria, RD média igual a 3,23; o tratamento com nisina, 1,7 RD; e o tratamento com lactato de sódio, 1,13 RD. A combinação dos antimicrobianos levou aos seguintes resultados: nisina e lactato de sódio, 1,4 RD; nisina e bacteriófago P100, 2,4 RD. Pode-se observar que a nisina melhorou o efeito do lactato de sódio, mas não do fago P100. Apesar dos esforços das indústrias de alimentos para erradicação da *L. monocytogenes* em produtos cárneos prontos para consumo, verifica-se ainda que é necessária a adoção de métodos mais rigorosos para o controle de *L. monocytogenes* nesses produtos, e o uso do bacteriófago P100 deve ser recomendado.

Palavras-chave: Antimicrobianos, alimento seguro, produtos cárneos, *Listeria monocytogenes*

Abstract

The emergence of strains of the bacteria resistant to antimicrobials linked to consumer demand for more natural foods, without chemical preservatives and with long shelf life, has become a critical issue for the food industry. Thus, it is necessary studies to increase the information on *L. monocytogenes* in ready-to-eat meat products, enabling the development of new strategies to control this pathogen in these products. The aim of this study was to evaluate the efficacy of antimicrobial in the control of the contamination using the bacteriophage P100, nisin and sodium lactate, separately and in combination. To this end, individual portions of the samples of pork ham were contaminated with *L. monocytogenes* 1/2a previously isolated of the product (inoculum of approximately 10^5 cells/ml) for 15 min. Was verified an adhesion of 10^3 cells/mL of the microorganism in the product. The treatment with bacteriophage P100 resulted in complete eradication of the bacteria, mean of 3.23 RD; nisin treatment, 1.7 RD; and sodium lactate, 1.13 RD. The combination of antimicrobials resulted in the following decimal reductions: nisin and sodium lactate, 1.4 RD; nisin and phage P100, 2.4 RD. It can be observed that nisin improved the effect of sodium lactate, but not of the phage P100. Despite efforts to eradicate *L. monocytogenes* in ready-to-eat meat products by food industry, still is necessary the use of more rigorous methods to control the bacteria in these products, and the use of bacteriophage P100 must be recommended.

Keywords: Antimicrobials, food safety, meat products, *Listeria monocytogenes*

Introdução

A primeira ligação conclusiva da *Listeria monocytogenes* com um surto de origem a alimentar foi em 1981, estimulando pesquisas para determinar a onipresença do microrganismo e sua forma de transmissão. Desde então, *L. monocytogenes* vem ganhando

reconhecimento como um importante patógeno veiculado por alimentos (Todd e Notermans, 2011).

O surgimento de bactérias patogênicas resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos disponíveis, associado à exigência dos consumidores por alimentos mais naturais, sem conservantes químicos e com longa vida útil, tornou-se um problema crítico para a indústria de alimentos moderna. Essa realidade veio abrir fronteiras para a aplicação de substâncias Geralmente Reconhecidas como Seguras (GRAS), como é o caso das bacteriocinas, bacteriófagos e ácidos orgânicos de cadeia curta (Carlton et al., 2005; Hagens, 2009; Nascimento et al., 2008).

Apesar do avanço na tecnologia de barreiras (barreiras de Leistner), a preservação de alimentos está ainda em debate, não apenas nos países desenvolvidos (onde a implantação das tecnologias para preservação é claramente necessária), mas também para o mundo industrializado. O conceito da tecnologia de barreiras tem sido aplicado na indústria de alimentos como um caminho racional, após a observação de que a sobrevivência de microrganismos decresce grandemente quando eles são confrontados com múltiplos fatores antimicrobianos (Leistner, 1978; Leistner e Gorris, 1995).

Atualmente, a aplicação de bacteriocinas como parte de tecnologias de barreiras tem ganhado atenção. Várias bacteriocinas mostram efeitos aditivos ou sinérgico quando usadas em combinação com outros antimicrobianos, incluindo preservativos químicos, compostos fenólicos naturais, assim como outras proteínas antimicrobianas. A efetividade de bacteriocinas é muitas vezes ditada pelos fatores como pH, temperatura, composição e estrutura do alimento, assim como a microbiota alimentícia. (Gálvez et al., 2007).

A utilização dos sais de ácidos orgânicos vem sendo bem documentada (Knight et al., 2007). Entretanto, poucas informações sobre o efeito da combinação dessas substâncias com outros antimicrobianos na sobrevivência e crescimento de *L. monocytogenes*.

Alguns estudos tem demonstrado o efeito sinérgico do bacteriófago P100 combinado com nisina (Leverentz et al., 2003). O uso simultâneo de bacteriocinas com outros agentes antimicrobianos pode ser útil não apenas para diminuir a dose da bacteriocina adicionada, mas também para evitar um novo crescimento de células adaptadas ou resistentes à bacteriocina. Nesse contexto, emerge a necessidade de estudos que avaliem o potencial antimicrobianos desses agentes isolados e em combinação para redução de um determinado patógeno em alimentos.

Materiais e Métodos

Determinação do título do bacteriófago P100 (LISTEX™P100)

Para a determinação do título do bacteriófago P100 utilizou-se o protocolo da EBI Food Safety, recomendado por Hagens e Offerhaus (2008).

Preparo das cepas bacterianas para inoculação

A cepa *L. monocytogenes*, sorotipo 1/2a, isolada e previamente de presunto suíno, e uma cepa *L. monocytogenes* Scott A(sorotipo 4b), ATCC 15313, foram reativadas em caldo triptona de soja com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE), com incubação a 37°C por 24 horas. Seguindo a incubação a cultura foi centrifugada a 3600 x g por 5min em microcentrifuga (Microcentrifuga Digital Spectrafuge 24D, Ref./Mod.: C2400-24D. Marca Labnet, São Paulo, SP, Brasil) e o “pellet” resultante foi lavado por 2 vezes e suspenso em tampão fosfato (PBS, ph 7,0), e diluído com água peptonada para ajuste em 0,5 pontos na escala de McFarland (10^8 UFC/mL). Para a inoculação no alimento, o inóculo foi diluído até a concentração de 10^4 UFC/mL (Carlton et al., 2005) e a população de *L. monocytogenes* foi

confirmada através do plaqueamento de 100 µL da suspensão da cultura em ágar ALOA com incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas (adaptado de Upadhyay et al., 2013).

Inoculação de *L. monocytogenes* em presunto suíno cozido e fatiado e uso dos tratamentos com os antimicrobianos

Um total de doze porções de presunto suíno ($25 \pm 0,5\text{g}$ cada) foram pesadas em cabine de fluxo laminar (Labconco Corporation, Labconco Purifier Class IIB, Total Exhaust, model 36210-04, certified ISO 9002, Kansas City, MO, USA), transferidas para placas de Petri e deixadas 15 minutos, cada lado, exposto a luz ultravioleta, para redução da carga microbiana inicial. Posteriormente, os tratamentos com 700 µL de nisina na concentração de 50 µg/L- NI (Kaur e Malik, 2013), 700 µL de lactato de sódio a 2% (p/v) - LS e 1000 µL do bacteriófago P100 (Carlton et al., 2005) (título de $1,5 \times 10^7$ Unidades Formadoras de Placas/mL) - FA foram adicionados, separadamente e usando a combinação nisina e lactato de sódio (1:1) - LSNI e nisina e bacteriófago (1:1) – FANI na superfície de cada amostra, e espalhados com alças de Drigalski estéreis. Para o controle foram utilizados 700 µL de água destilada estéril no lugar dos antimicrobianos. As fatias de presunto tratadas foram deixadas por 15 minutos em cabine de fluxo laminar para permitir que as soluções fossem absorvidas. As superfícies tratadas foram inoculadas com 1mL do inóculo da cepa de *L. monocytogenes*, sorotipo 1/2a (Tang et al., 2013) e deixadas por mais 15 min. em cabine de fluxo laminar para permitir a adesão bacteriana (Soni et al., 2009). Após a etapa de adesão, as amostras denominadas do dia zero foram submetidas às análises para contagem da bactéria, e as amostras referentes ao dia 3 (prazo de validade do produto) foram armazenadas a 7°C e submetidas à enumeração de *L. monocytogenes* após 72 horas.

Enumeração de *L. monocytogenes* inoculada artificialmente em presunto suíno após os tratamentos.

Cada amostra tratada e controle (tempo zero e 72 horas) foram homogeneizadas com 250 mL de água peptonada tamponada, por 2 min, em homogeneizador do tipo stomacher (240 bpm; modelo ITR 1204, série 126, São Paulo, SP, Brasil). Posteriormente, 100 µL de cada homogeneizado foram inoculados na superfície do ágar Aloa, seguido de incubação a 37°C por 24 horas, e a contagem das colônias característica (colônias azuis-esverdeadas com halo opaco) foi efetuada em placas contendo entre 30 e 300 UFC. O valor médio das contagens foi expresso como UFC/g. Os tratamentos das amostras com seus respectivos controles foram realizados por três vezes, sendo as contagens das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) obtidas sempre em duplicata e expressas como valor médio das contagens.

Análise dos dados

Todas as contagens obtidas foram convertidas em logaritmos e o número de reduções decimais (RD) foi calculado através da diferença entre a contagem inicial das células (controle) e a contagem das células obtida após os tratamentos. O experimento foi conduzido em esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas os cinco tratamentos e o controle, e nas subparcelas, dois períodos (tempo zero e 72 horas). Para a avaliação estatística foi utilizada a análise de variância ANOVA e o teste de Tukey para determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos valores médios das contagens microbianas obtidas após os tratamentos. Para a análise estatística utilizou-se o software Excel e PAST.

Resultados e Discussão

Título do Bacteriófago

O princípio do método de determinação do título do bacteriófago é baseado no fato de que após a etapa de infecção da bactéria hospedeira por bacteriófagos líticos ocorre a replicação do vírion e as células infectadas da bactéria rompem-se (lise) e liberam partículas fágicas que são adsorvidos pela célula adjacente e uma nova progênie fágica é liberada para infectar novas células hospedeiras, caracterizando o ciclo lítico. O número de lises fornece um número estimado de partículas de fago. A formação do halo ou placas de lise determina a sensibilidade da bactéria ao fago e o número de halos determinará o título do mesmo (Pelczar Jr et al., 1987).

A importância da determinação do título do bacteriófago deve-se ao efeito dose-dependente comprovados por ensaios conduzidos por Carlton et al. (2005), Soni et al. (2009) e Vermeiren et al. (2007).

O título do bacteriófago P100 no presente estudo foi da ordem de $1,5 \times 10^7$ UFP/ml. Experimento conduzido por Vermeiren et al., (2007), com uma concentração de 10^7 UFP/cm², comprovou a eficácia do bacteriófago na redução de *L. monocytogenes* em presunto cozido. Estudo toxicológico, realizados em ratos, comprovou que uma dose elevada de P100 em até 5×10^{11} UFP/mL foi bem tolerada, sem mortalidade, morbidade, ou alterações histopatológicas (Carlton et al.,2005).

Adesão de *L. monocytogenes* em presunto suíno cozido e fatiado

A utilização do inóculo de *L. monocytogenes* na concentração de 10^4 UFC/mL foi baseada nas recomendações de Carlton et al. (2005), visando a obtenção de uma população final de *L. monocytogenes* (após a adesão) de aproximadamente 10^3 UFC/g no produto. A população de *L. monocytogenes* após a adesão no alimento foi de $3,1 \times 10^4 \pm 2,1$ UFC/g ($4,49 \pm 0,1$ ciclos log).

A população de *L. monocytogenes*, após a etapa de adesão, nas amostras de presunto suíno as 0 e 72 horas estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Contagem (UFC/g) de *Listeria monocytogenes* inoculadas artificialmente em presunto suíno, mantidos a 7°C.

Repetição	Tempo			
	0 horas		72 horas	
	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g
1 ^a	$5,2 \times 10^2$	2,7	$1,8 \times 10^3$	3,3
2 ^a	$8,3 \times 10^2$	2,9	$1,6 \times 10^3$	3,2
3 ^a	$7,9 \times 10^2$	2,9	$1,7 \times 10^3$	3,2
Média	$7,13 \times 10^2 \pm 1,69$	$2,8 \pm 0,11$	$1,7 \times 10^3 \pm 0,1$	$3,23 \pm 0,06$

± desvio-padrão

Observa-se que o valor médio da contagem de *L. monocytogenes* após a etapa de adesão foi de $7,13 \times 10^2$ UFC/g, o que corresponde a 2,8 ciclos logarítmicos. Após 72 horas (dia 3) verificou-se um aumento de 0,43 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* no presunto suíno, o que já era esperado considerando-se o caráter psicrotrófico da bactéria. Deste modo reforça-se que os alimentos contaminados por *L. monocytogenes* não possuem na refrigeração uma medida de controle, pois a bactéria tende a crescer nesta condição, podendo atingir níveis suficientemente altos para provocar listeriose nos indivíduos que venham a consumir o

alimento. A bactéria é capaz de sobreviver em condições de frio e pode realmente se multiplicar, mesmo que lentamente, em refrigeração (Schmid et al., 2009).

Em estudo com queijos de massa macia (queijo do tipo minas frescal e do tipo Coalho), o período de 30 minutos foi suficiente para adesão completa da bactéria. Após sete dias de refrigeração das amostras, os autores observaram um aumento da população de *L. monocytogenes* foi de aproximadamente 1 ciclo logarítmico (Silva et al., 2014).

Nos ensaios conduzidos por Rossi et al. (2010) realizados com linguiça suína frescal crua, os autores verificaram que a etapa de adesão de 1 hora foi necessária para adesão completa do microrganismo. Os autores também observaram que após 10 dias sob temperatura de refrigeração a população de *L. monocytogenes* aumentou de 1 ciclo log.

Eficácia dos tratamentos antimicrobianos no controle *L. monocytogenes* inoculada artificialmente em presunto suíno cozido e fatiado.

Os resultados obtidos nos tratamentos com os antimicrobianos podem ser considerados na Tabela 2.

Na Tabela 2 pode-se constatar a erradicação da população de *L. monocytogenes* inoculada artificialmente em presunto suíno com o tratamento utilizando o bacteriófago P100, tanto 15 minutos após o tratamento, como no dia 3 (72 horas pós-tratamento), ou seja, o tratamento com bacteriófago P100 na concentração de $1,5 \times 10^7$ UFP/mL foi suficiente para erradicar as células de *L. monocytogenes* inoculadas artificialmente no presunto suíno sem gordura.

Semelhante aos ensaios conduzidos por Silva et al.(2014) e Rossi et al. (2010), o bacteriófago P100 reduziu em média 2,83 a 3,23 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* na amostra de presunto suíno, o que foi suficiente para eliminar totalmente o microrganismo no alimento.

Tabela 2. Redução na população de *L. monocytogenes* após tratamento com bacteriófago P100.

<i>Listeria monocytogenes</i> Log ₁₀ (UFC/g)						
Repetição	Dia zero			Dia três		
	Controle	Tratamento	RD	Controle	Tratamento	RD
1 ^a	2,7	0,0	2,7	3,3	0,0	3,3
2 ^a	2,9	0,0	2,9	3,2	0,0	3,2
3 ^a	2,9	0,0	2,9	3,2	0,0	3,2
Média	2,83± 0,11	-	2,83± 0,11	3,23 ± 0,06	-	3,23 ± 0,06

± desvio-padrão.

RD – redução decimal

A metodologia utilizada no estudo, realizando o tratamento do alimento antes da etapa de adesão bacteriana pode ter sido importante para a erradicação da bactéria. Considerando que a etapa de fatiamento é crítica na contaminação por *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos fatiados, optou-se por realizar o tratamento antes da etapa de inoculação da bactéria, diferentemente dos ensaios conduzidos por Silva et al. (2014) e Rossi et al. (2010). Os resultados descritos na Tabela 2 permitem inferir que quando o fago é adicionado como tratamento preventivo o mesmo dificulta a adesão da bactéria ao alimento.

Vale ressaltar, que a eficácia das partículas do bacteriófago em um determinado substrato alimentar pode ser afetada pelo tipo de matriz (ou seja, líquido ou sólido). Alguns fatores podem comprometer a ação do fago, como redução do teor de água da superfície e capacidade de certos fatores alimentares associados que levam à degradação estrutural das partículas fágicas (Guenther et al., 2009; Hagens e Offerhaus, 2008).

Vermeiren et al. (2007) observaram que o tratamento com o bacteriófago P100 na concentração de 2×10^7 UFP/mL resultou em uma redução média de 1,6 log₁₀ UFC/g nas contagens de *L. monocytogenes* em amostras de filés de peixes, redução inferior à obtida no

presente estudo. Ainda, segundo os autores, quando se usou o fago na concentração 2×10^5 UFP/mL de fago, houve uma ligeira redução da população bacteriana (de $0,4 \log_{10}$ UFC de *L. monocytogenes*), que também diferiu significativamente do controle ($p < 0,05$).

Um estudo com presunto suíno cozido inoculado artificialmente com *L. monocytogenes*, demonstrou que a população de *L. monocytogenes* aumentou em $3,77 \log_{10}$ UFC/g durante 27 dias de armazenamento do produto embalado a vácuo, enquanto que nas amostras do mesmo presunto tratadas com P100 a uma concentração de 5×10^6 UFP/cm² ou 1×10^7 UFP/cm², a população da bactéria aumentou em 3,18 e 0,91 \log_{10} UFC/g, respectivamente. Essa diferença no efeito antilisterial entre as duas doses de P100 utilizadas, foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), segundo os autores. Esses resultados permitiram concluir que o tratamento com 1×10^7 UFP/cm² do bacteriófago foi mais eficiente para controlar o crescimento de *L. monocytogenes*, ou seja, o efeito é dose-dependente (Vermeiren et al., 2007). A Tabela 3 demonstra os resultados da ação da bacteriocina nisina sobre *Listeria monocytogenes*.

Tabela 3. Redução na população de *L. monocytogenes* após tratamento com a bacteriocina nisina (50µg/L).

<i>Listeria monocytogenes</i> Log ₁₀ (UFC/g)						
Repetição	Dia zero			Dia três		
	Controle	Tratamento	RD	Controle	Tratamento	RD
1 ^a	2,7	2,4	0,3	3,3	2,1	1,2
2 ^a	2,9	0,0	2,9	3,2	0,0	3,2
3 ^a	2,9	0,0	2,9	3,2	2,6	0,6
Média	2,83 ± 0,11	0,8 ± 1,38	2,03 ± 1,5	3,23 ± 0,06	1,57 ± 1,38	1,7 ± 1,36

± desvio-padrão.

RD – redução decimal

Os resultados obtidos no tratamento com a nisina demonstraram que em um dos experimentos (experimento 2), tanto no dia zero como no dia três (72 horas), a bacteriocina na concentração usada (50µg/L) foi suficiente para erradicar a população da bactéria. Ainda, no dia zero, outra repetição demonstrou que o tratamento levou à erradicação da bactéria. Entretanto esse padrão não foi observado nas outras repetições, e o valor médio da RD foi de $2,03 \pm 1,5$ para o dia zero e de $1,57 \pm 1,38$ para o dia 3, evidenciando desse modo que o aumento populacional da bactéria afetou a eficácia do antimicrobiano.

O tratamento com o lactato de sódio reduziu o crescimento de *L. monocytogenes* em todas as três repetições (Tabela 4). O valor médio das reduções foram de 0,37 e 1,13 ciclos log nos dias zero e três, respectivamente.

De acordo com Rilla et al. (2004) a eficiência das bacteriocinas depende do nível de contaminação do alimento pelo microrganismo alvo. Contaminações elevadas comprometem a atividade da bacteriocina, não impedindo o desenvolvimento do microrganismo deteriorante ou patogênico.

Tabela 4. Redução da população de *L. monocytogenes* após tratamento com lactato de sódio 2% (p/v)

<i>Listeria monocytogenes</i> Log ₁₀ (UFC/g)						
Repetição	Dia zero			Dia três		
	Controle	Tratamento	RD	Controle	Tratamento	RD
1 ^a	2,7	2,4	0,3	3,3	1,8	1,5
2 ^a	2,9	2,7	0,2	3,2	2,3	0,9
3 ^a	2,9	2,3	0,6	3,2	2,2	1,0
Média	2,83± 0,11	2,47± 0,21	0,37 ± 0,21	3,23 ± 0,06	2,1 ± 0,27	1,13 ± 0,32

± desvio-padrão.

RD – redução decimal

Esses resultados demonstram que o tratamento com o sal foi pouco eficaz. Resultados diferentes foram relatados por Silva et al. (2014) que demonstraram que a aplicação de lactato de sódio foi eficaz na redução dos níveis de contaminação por *L. monocytogenes* em queijos de massa macia.

O presente resultado corrobora com Zhu et al.(2009) que verificaram que a adição de Lactato de sódio (2%) na formulação de peito de peru não conseguiu impedir o crescimento de *L. monocytogenes* de crescimento durante o armazenamento refrigerado.

Os resultados referentes aos tratamentos combinados, nisina e lactato de sódio, e nisina e bacteriófago P100, estão descritos nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5. Redução na população de *L. monocytogenes* após tratamento com lactato de sódio 2%(p/v) e nisina (50 µg/L), na proporção 1:1.

<i>Listeria monocytogenes</i> Log ₁₀ (UFC/g)						
Repetição	Dia zero			Dia três		
	Controle	Tratamento	RD	Controle	Tratamento	RD
1 ^a	2,7	2,4	0,3	3,3	2	1,3
2 ^a	2,9	2,7	0,2	3,2	2	1,2
3 ^a	2,9	2,1	0,8	3,2	1,5	1,7
Média	2,83± 0,11	2,4 ± 0,3	0,43 ± 0,32	3,23 ± 0,06	1,83 ± 0,24	1,4 ± 0,26

± desvio-padrão.

RD – redução decimal

Quando combinados os tratamentos lactato de sódio 2%(p/v) e nisina (50 µg/L), foram observados valores médios de reduções decimais, tanto no dia zero como no dia três, inferiores ao tratamento isolado da bacteriocina. Entretanto, na comparação com o tratamento com o lactato de sódio, observa-se que a combinação do sal com a bacteriocina levou a um ligeiro aumento da RD, tanto no dia zero como no dia três (Tabela 4 e Tabela 5).

Embora alguns relatos da literatura demonstrem que a nisina pode aumentar significativamente o comprimento da fase de latência e reduzir a taxa de crescimento de *L. monocytogenes* em presuntos (Jofre et al., 2007) quando utilizada combinada com lactato de sódio, os resultados encontrados no presente estudo corroboram com os de Tang et al. (2013) que observaram que a adição de diacetato de sódio com nisina apresentou um efeito antagonista quando comparado com a utilização isolada dos antimicrobianos em salmão.

Resultados semelhantes também têm sido relatados para a combinação de nisina e os ácidos orgânicos (ou os seus sais) na redução da população inicial de *L. monocytogenes* em produtos, como salsichas de peru (Lungu e Johnson, 2005), salsichas, presunto (Geornaras et al., 2005; Geornaras et al., 2006). A adição de ácido orgânico não resultou de forma significativa na redução de células viáveis de *L. monocytogenes* quando comparada com a adição de nisina isolada.

A Tabela 6 demonstra os resultados obtidos para o tratamento bacteriófago com nisina nos dias zero e três.

Tabela 6. Redução na população de *L. monocytogenes* após tratamento com o bacteriófago P100 e nisina (50 µg/L)

<i>Listeria monocytogenes</i> Log ₁₀ (UFC/g)						
Repetição	Dia zero			Dia três		
	Controle	Tratamento	RD	Controle	Tratamento	RD
1 ^a	2,7	1,7	1,0	3,3	1,0	2,3
2 ^a	2,9	2,6	0,3	3,2	0,0	3,2
3 ^a	2,9	2,5	0,4	3,2	0,0	3,2
Média	2,83± 0,11	2,27± 0,49	0,57 ± 0,38	3,23 ± 0,06	0,33 ± 0,58	2,9 ± 0,42

± desvio-padrão.

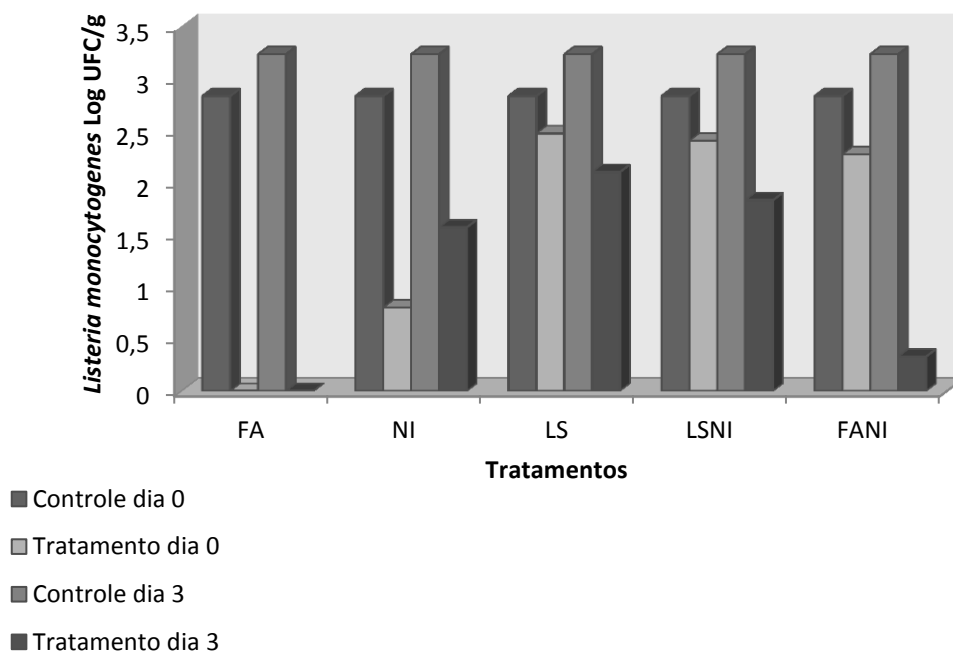
RD – redução decimal

De acordo com a Tabela 6, pode-se verificar que no dia zero houve uma ação antagonista na combinação do bacteriófago com a bacteriocina, com uma redução decimal média de apenas 0,57 (\pm 0,38) ciclos log. Entretanto, resultados diferentes foram obtidos no dia três (72 horas) do experimento, onde se obteve uma RD bem expressiva, ou seja, $2,9 \pm 0,42$ ciclos log. Ainda, com relação ao dia três, analisando os experimentos isoladamente, observa-se que a ação combinada da nisina e do fago levou a erradicação da bactéria (experimentos 2 e 3), demonstrando que nesse caso a nisina não prejudicou a ação do fago. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que o aumento da população de *L. monocytogenes* (de 2,83 no dia zero para 3,23 no dia três) pode ter facilitado o encontro do fago com a bactéria. O uso de nisina em combinação com outros antimicrobianos é recomendado no sentido de poder diminuir a concentração da bacteriocina nos tratamentos.

Os resultados encontrados no presente estudo diferem dos resultados encontrados por Leverentz et al. (2003), que verificaram uma ação sinérgica da nisina com o bacteriófago P100 na redução de *L. monocytogenes* em frutas.

Finalmente, a análise dos resultados do presente estudo indica que embora todos os tratamentos tenham, em maior ou menor grau, levado à redução na população de *L. monocytogenes* inoculada em presunto suíno cozido e fatiado, o tratamento com o bacteriófago P100 foi o que resultou em melhores resultados, sendo suficiente para erradicar a bactéria tanto no dia zero como no dia três, demonstrando estabilidade sob refrigeração. O tratamento com nisina foi o segundo melhor antimicrobiano, seguido do lactato de sódio e nisina, bacteriófago e nisina, e lactato de sódio isoladamente (Figura 1).

Figura 1. Comparação entre os valores médios encontrados para as reduções decimais (RD) na população de *L. monocytogenes* após a utilização dos antimicrobianos.



Análise Estatística

A partir dos dados encontrados na análise da sobrevivência de *L. monocytogenes* em função da adição ou não dos tratamentos antimicrobianos, englobando os dois períodos de tempo (dia zero e dia três), a Tabela 7 apresenta os resultados da análise estatística para comparação da eficácia dos tratamentos.

Os resultados expressos na Tabela 7 demonstram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos bacteriófago e nisina, no dia três do experimento, ou seja, após a refrigeração do alimento. No dia zero desses mesmos tratamentos não se observou diferença significativa ($p > 0,05$). Ainda, no dia três do experimento, observa-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na comparação do grupo controle e o

tratamento com o fago P100, tanto isolado como em combinação com a nisina. Esses resultados demonstram que embora a nisina não tenha levado à redução expressiva na população da bactéria como o bacteriófago P100, após a refrigeração do alimento (dia três), essa redução foi estatisticamente significativa.

Tabela 7. Valores médios das contagens de *L. monocytogenes* (sorotipo 1/2a) isolada de presunto suíno e *L. monocytogenes* Scott A (sorotipo 4b), em função da adição ou não dos tratamentos antimicrobianos, nos tempos zero e três dias.

	<i>Listeria monocytogenes</i> Log ₁₀ (UFC/g)	
	Dia zero	Dia três
Controle	2,83a	3,23a
Tratamento Fago	0,00b	0,00b
Tratamento Nisina	0,80b	1,57a
Tratamento Lactato de Sódio	2,47a	2,10a
Tratamento Lactato de Sódio + Nisina	2,40a	1,83a
Tratamento Fago + Nisina	2,27a	0,33b

* Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Conclusão

Os resultados do presente estudo permitem reforçar o caráter psicrotrófico de *L. monocytogenes* observado após a refrigeração do produto por três dias, o que prejudicou a ação dos antimicrobianos nisina e do lactato de sódio. Entretanto, o tratamento com o bacteriófago P100 não foi afetado pelo período da refrigeração, demonstrando ser esse o método de escolha

para o controle da bactéria no alimento estudado. Ainda, pode-se concluir do estudo que a ação combinada da nisina com os outros antimicrobianos não melhorou a eficácia no controle da contaminação por *L. monocytogenes*.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia pela bolsa de estudos concedida.

Referências

Carlton, R. M.; Noordman, W. H.; Biswas, B.; Meester, E. D.; Loessner, M. J. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 43, p. 301-312, 2005.

EBI Food Safety. FDA and USDA extend GRAS approval for LISTEX™ for all food products. News 2007, July, 2007. Disponível em: <http://www.ebifoodsafety.com/en/news-2007.aspx>. Acesso: Dezembro de 2013.

Galvez, A.; Abrioul, H.; López, R.L.; Omar, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food microbiology* v.120, p 51-70,2007.

Geornaras, K.E.; Belk, J.A.; Scanga, P.A.; Kendall, G.C.; Smith, J.N.; Sofos. Postprocessing antimicrobial treatments to control *Listeria monocytogenes* in commercial vacuum-packaged bologna and ham stored at 10 °C. *Journal of Food Protection*, v. 68, p. 991–998, 2005.

Geornaras, P.N.; Skandamis, K.E.; Belk, J.A.; Scanga, P.A.; Kendall, G.C.; Smith, J.N.; Sofos. Post-processing application of chemical solutions for control of *Listeria monocytogenes*, cultured under different conditions, on commercial smoked sausage

formulated with and without potassium lactate-sodium diacetate. *Food Microbiology*, v.23, p. 762–771, 2006.

Geornaras, P.N.; Skandamis, K.E.; Belk ; Scanga, J.A.; Kendall, P.A.; Smith, G.C., Sofos, J.N. Postprocess control of *Listeria monocytogenes* on commercial frankfurters formulated with and without antimicrobials and stored at 10 °C. *Journal of Food Protection*, v. 69 p. 53–61, 2006.

Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., Loessner, M. J., 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p. 93-100, 2009.

Hagens, S.; Offerhaus, M. L. Bacteriophages – New weapons for foods safety. *Food Technology*, v. 62, n. 4, p. 46-54, 2008.

Hagens, S. A new era in the fight against Liseria. *Food Marketing & technology*, v.23, n. 2, p 26-28, 2009.

Jofre, A.; Garriga, M., Aymerich , T. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham through active packaging with natural antimicrobials and high-pressure processing. *Journal of Food Protection*, v. 70, p. 2498–2502, 2007.

Kamlesh A. Soni, Monil Desai, Ademola Oladunjoye, Frederick Skrobot, Ramakrishna Nannapaneni. Reduction of *Listeria monocytogenes* in queso fresco cheese by a combination of listericidal and listeriostatic GRAS antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*, n. 155, p. 82–88, 2012.

Knight, T.D; Castillo, A. ; Maxim, J. ; Keeton, J.T; Miller, R.K. Effectiveness of Potassium Lactate and Sodium Diacetate in Combination with Irradiation to Control *Listeria monocytogenes* on Frankfurters. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 1, p. 26–30.

Leistner, L. Shelf stable products and intermediate moisture foods based on meats. In: Rockland, L.B., Beuchat, L.R. Water activity: theory and application to foods. New York: Marcel Dekker, 1987, p.295-327.

Leistner, L., Gorris, L.G.M. Food preservation by hurdle technology. Trends in Food Science & Technology, v. 6, p. 41-46, 1995

Leverentz, B., Conway, W. S., Camp, M. J., Janisiewicz, W., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R., Sulakvelidze, A. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. Applied Environmental Microbiology, v. 69, p.4519-4526, 2003.

Lungu, B.; Johnson, M.G. Fate of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of model turkey frankfurter pieces treated with zein coatings containing nisin, sodium diacetate, and sodium lactate at 4 °C. Journal of Food Protection, v.68, p. 855–859, 2005.

Nascimento, M. S.; Moreno, L.; Kuaye, A, Yoshiteru. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. Brazilian Journal of Food Technology, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

Oliveira, M. M. M. de et al . Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 41, n. 1, mar. 2010.

Pelczar Jr., M. J.; Chan, E. C. S.; Krieg, Noel R. K. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo, SP: Makron Books do Brasil: Pearson Education do Brasil, 1997.

Rilla, N, Martinez, B., Rodrigues. A. Inhibition of a methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega Pitu cheese by the nisin Z producing strain *Lactococcus lactis*. IPLA **729**, v. 67, n. 5, p. 928-933, 2004.

Rossi L. P.R., Almeida, R. C.C., Lopes, L. S. , Figueiredo A. C.L., Ramos, M. P.P. Almeida, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in Brazilian fresh sausage and control of *Listeria monocytogenes* using bacteriophage P100. Food Control, v. 22, p. 954 – 958, 2009.

Schmid B, Klumpp J, Raimann E, Loessner MJ, Stephan R, and Tasara T. Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions.

Applied and Environmental Microbiology, v.75, p. 1621–1627, 2009.

Silva, E. G. N. Eficácia do Bacteriófago P100 e sais de ácidos orgânicos no controle da contaminação por *Listeria monocytogenes* inoculada artificialmente em queijos. 2011. 129f.

Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

Silva, E.N.G. et al. Control of *Listeria monocytogenes* growth in soft cheeses by bacteriophage P100. Brazilian Journal of Microbiology, v.45, n.1, p.11-16. 2014.

Silva, N. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3ª ed. São Paulo: Varela, 2007. 536p.

Soni, K. A.; Nannapaneni, R.; Hagens, S. Reduction of *Listeria monocytogenes* on the Surface of Fresh Channel Catfish Fillets by Bacteriophage Listex P100. Foodborne Pathogens and Disease, v.7, p.1– 8. 2009.

Todd , E.C.D. ; Notermans, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. Food Control, v. 22, p. 1484-1490,2011.

Tang, S.; Stasiewicz, M.J.; Wiedmann, Martin, Boor, K.J.; Bergholz, T.M. Efficacy of different antimicrobials on inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in laboratory medium and on cold-smoked salmon, International Journal of Food Microbiology, v.165, n.3, p. 265–275, 2013.

Upadhyay, A.; Upadhyaya, I.; Anup Kollanoor-Johny, A.; Baskaran,S.A.; Karumathilp, S.M.D.; Venkitanarayanan, K. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters by plant-derived antimicrobials alone or in combination with hydrogen peroxide. Food Microbiology, v. 163, p.114-8, n. 2013