

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANANIZA GONÇALVES PIRES TELES



**OCORRÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DE *Listeria* spp. EM PRESUNTOS
FATIADOS PELA INDÚSTRIA E PELO COMÉRCIO VAREJISTA**

PALOTINA

2017

ANANIZA GONÇALVES PIRES TELES

**OCORRÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DE *Listeria* spp. EM PRESUNTOS
FATIADOS PELA INDÚSTRIA E PELO COMÉRCIO VAREJISTA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

PALOTINA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

T269 Teles, Ananiza Gonçalves Pires
Ocorrência e quantificação de *Listeria spp.* em presuntos
fatiados pela indústria e pelo comércio varejista /
Ananiza Gonçalves Pires Teles . -- Palotina, 2017
81f.

Orientador: Luciano dos Santos Bersot
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. *Listeria spp.* 2. *L. monocytogenes*. 3. Indústria .
I. Bersot, Luciano dos Santos. II. Universidade Federal do
Paraná. III. Título.

CDU 663.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANANIZA GONÇALVES PIRES TELES** intitulada: **OCORRÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DE *Listeria spp.* EM PRESUNTOS FATIADOS PELA INDÚSTRIA E PELO COMÉRCIO VAREJISTA**, após terem lido e analisado a mesma e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pelo seu APROVAÇÃO no ato da defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 28 de Outubro de 2017.

LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

VANESSA MENDONÇA SOARES
Avaliador Externo (UNIPAMPA)

JULIANO GONÇALVES PEREIRA
Avaliador Externo (UNIPAMPA)

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Ananiza Gonçalves Pires Teles, casada com Lucas de Miranda Teles, filha de Carlos Augusto Gonçalves Pires e Neusa Silva Pires, nascida em 19 de março de 1979 na cidade de Osasco, estado de São Paulo. Médica Veterinária formada no ano de 2005 pela Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina. Pós-graduada em Segurança de Alimentos pela Universidade Paranaense - UNIPAN em 2009. Médica Veterinária na Clínica Puppyland no ano de 2005. Médica Veterinária – Analista Industrial do Frigorífico Aves da BRF SA Toledo/PR entre os anos de 2006 a 2015, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina na linha de pesquisa Microbiologia aplicada à Produção Animal entre os anos de 2015 a 2017, Analista de Qualidade da Fábrica de Industrializados Aves da BRF SA Toledo/PR desde setembro de 2016.

*Dedico este trabalho à Deus, aos meus pais,
Carlos e Neusa, ao meu esposo, Lucas,
e aos meus filhos, Davi e Samuel,
pessoas que me amam
incondicionalmente.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me deu a vida e tem me sustentado desde o meu nascimento me proporcionando saúde, inteligência e garra para as minhas conquistas.

Aos meu pais que me ensinaram a falar, andar, me amaram, cuidaram de mim e me deram condições e perspectivas para o futuro sempre priorizando o estudo e o conhecimento por meio da ciência mesmo que isso demandasse distância física e gastos financeiros. Em especial a minha mãe que sempre teve o sonho de ter uma filha Mestra. Amo vocês que são meu exemplo de vida, ética, decência, temor e confiança em Deus, sou o que sou hoje porque na lá início de todo estavam vocês sempre de braços abertos me apoiando!

Ao meu esposo Lucas e aos meus filhos Davi e Samuel que suportaram as ausências aos finais de semana, entenderam as noites em claro que a mamãe tinha que ficar acordada estudando, a casa bagunçada por falta de tempo, o mal humor de tanto cansaço, enfim, vocês foram meu alicerce para não desistir desta jornada. Deixo aqui meu muito obrigada! Não teria conseguido se não fosse o amor e o cuidado de vocês para comigo.

Aos meus amigos de perto e de longe, aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos que sempre entenderam a minha constante ausência nos eventos e encontros, e os telefonemas nunca retornados durante a fase do mestrado.

Ao meu antigo chefe na BRF SA, Gerson Scarpari por ter me deixado começar a fazer as disciplinas como aluna especial no programa de mestrado, mesmo sem saber o seu apoio foi fundamental! Aos meus colegas de trabalho da garantia da qualidade e a minha amada equipe do industrializados que sempre me deram força para suportar as pressões do dia a dia. À Raquel Wendt, minha “chefe” que sempre entendeu as ausências nos finais de semana por conta do mestrado.

À UFPR e toda equipe do LACOMA, desde os residentes, mestrandos, professores até todos os alunos de iniciação científica e estagiários que me ajudaram nas análises. Thiago e Carolina, eu não teria conseguido acabar o experimento se não fossem vocês me ajudando dia a dia, inclusive aos finais de semana, Deus retribua em dobro todo trabalho e tempo dedicados ao meu projeto.

Não poderia de deixar de citar as amizades que fiz neste período e que ficarão por toda a vida: Ana Paula Perin, Ana Paula, Cibele, Camila, Kamila, Professora Maira, Erton. Os meus dias com toda a certeza ficaram mais leves, divertidos e produtivos

na presença de vocês. Ana Paula Perin, você foi a pessoa que me ensinou a fazer as análises, sou muito grata, sucesso sempre!

Ao meu orientador, Professor Luciano dos Santos Bersot, que foi decisivo na minha permanência no mestrado. Obrigada por ter me apresentado à área de Inspeção desde os tempos de graduação, por sempre me apoiar, por confiar e não deixar eu desistir em nenhum momento! Você foi a pessoa que acreditou em mim desde o começo! Obrigada por tudo!

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos no período que fiquei sem trabalho e por fim, à Fundação Araucária, agência financiadora do projeto.

*“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo
e pensar uma coisa diferente. ”*

Roger Von Oech

RESUMO

Listeria monocytogenes é um agente patogênico transmitido por alimentos, causador de listeriose e tem sido isolado de produtos cárneos prontos para consumo (RTE). O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência e quantificação de *Listeria monocytogenes* em presuntos cozidos fatiados e embalados pela indústria e em presuntos cozidos fatiados e embalados no varejo. As amostras foram analisadas após a aquisição (Tempo 1) e ao fim da validade indicada no rótulo (Tempo 2). A quantificação e a detecção de presença e ausência de *Listeria monocytogenes* nas amostras foi obtida por meio da metodologia ISO 11290-1 e 11290-2. Além disso, foram realizados testes fenotípicos para diferenciação de *Listeria* spp. que compreenderam teste de catalase, coloração de gram, motilidade, β - hemólise e fermentação de açúcares (xilose, ramnose, dextrose e manitol). Foram escolhidas três marcas distintas de empresas com importância na comercialização de derivados cárneos no mercado nacional, as quais foram adquiridas em quatro supermercados conforme disponibilidade de venda. Foram avaliadas 60 amostras provenientes da indústria nas quais não foi detectado *Listeria monocytogenes*. Contudo, nas 60 amostras analisadas do varejo, 23,3 % apresentaram presença de *Listeria* spp.. As espécies que apresentaram a maior frequência nas amostras do varejo foram *L. ivanovii* (37,5 %), *L. seeligeri* (37,5 %), *L. innocua* (23,6 %) e *L. welshimeri* (1,3 %). As amostras do varejo foram analisadas quanto ao tempo de prateleira e 27 amostras (45 %) apresentaram validade superior a 5 dias, dessas, 21 amostras (35%) foram adquiridas no mesmo estabelecimento comercial (GP). As amostras também foram submetidas a contagem de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) nas quais houve aumento de 3 logs nas amostras com fatiamento na indústria e 2 logs nas amostras com origem de fatiamento no comércio varejista.

Palavras-chave: *Listeria* spp. *L. monocytogenes* Presunto fatiado Indústria Varejo

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen that causes listeriosis and has been isolated from ready-to-eat meat. The objective of this work was to verify the occurrence and quantification of *Listeria monocytogenes* in sliced and packaged hams by the industry and also in sliced and packaged hams at retail. Samples were analyzed after the acquisition (Time 1) and at the expiration of the validity indicated on the label (Time 2). Quantification and detection of presence and absence of *Listeria monocytogenes* in the samples were obtained using the methodology ISO 11290-1 and 11290-2. In addition, phenotypic tests for differentiation of *Listeria* spp. were conducted including catalase testing, gram staining, motility, β -hemolysis and fermentation of sugars (xylose, rhamnose, dextrose and mannitol). Three different brands of companies with importance in the commercialization of meat products in the national market were chosen, which were acquired in four supermarkets according to the products availability. Were evaluated 60 samples from the industry in which *Listeria monocytogenes* was not detected. However, in the 60 samples analyzed from retail, 23,3 % showed presence of *Listeria* spp.. The species that presented the highest frequency in the retail samples were *L. ivanovii* (37,5 %), *L. seeligeri* (37,5 %), *L. innocua* (23,6 %) and *L. welshimeri* (1,3 %). Retail samples were analyzed according to the shelf life where 27 samples (45 %) showed validity for more than 5 days, in which 21 samples (35 %) were acquired at the same commercial establishment. The samples were also submitted to a Lactic Acid Bacteria (LAB) count in which there was an increase of 3 logs in the samples with slice in the industry and 2 logs in the samples with origin of slicing in the retail trade.

Key-words: *Listeria* spp. *L. monocytogenes* Slice ham Industry Retail

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - TUBOS COM CALDO FRASER DEMONSTRANDO A PRESENÇA DE CULTURAS DE <i>LISTERIA</i> SPP. QUE HIDROLISAM A ESCULINA (TUBOS ENEGRECIDOS) E TUBO SEM A PRESENÇA DE CULTURAS DE <i>LISTERIA</i> SPP (TUBOS COM COLORAÇÃO AMARELA).....	46
FIGURA 2 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROTOCOLO UTILIZADO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	47
FIGURA 3 - PLACA DE TSA-YE COM COLÔNIAS AZULADAS, CARACTERÍSTICA DO GÊNERO <i>LISTERIA</i>	48
FIGURA 4 - TESTE DE MOTILIDADE EM MEIO SIM – PRESENÇA DE MOTILIDADE CARACTERÍSTICA EM “GUARDA CHUVA”	49
FIGURA 5 - PLACA DE ÁGAR SANGUE COM PRESENÇA DE β -HEMÓLISE.....	50
FIGURA 6 - FEMENTAÇÃO DE AÇÚCARES – INOCULAÇÃO POR PICADA.....	51
FIGURA 7 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROTOCOLO UTILIZADO PARA QUANTIFICAÇÃO DE BAL.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESPÉCIES “NOVAS” E “CLÁSSICAS” DO GÊNERO <i>LISTERIA</i> DIVIDIDAS EM DOIS GRANDES GRUPOS E EM TRÊS GÊNEROS CONFORME PROPOSTO POR ORSI E WIEDMANN (2016).....	33
TABELA 2 - ALGUMAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE ESPÉCIES DE <i>LISTERIA</i>	35
TABELA 3 - NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS DE PRESUNTO COZIDO POR MARCA NOS ESTABELECIMENTOS COMERCIAIS DA REGIÃO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ.....	43
TABELA 4 - TEMPO DE PRATELEIRA DOS PRESUNTOS COZIDOS FATIADOS NA PRÓPRIA INDÚSTRIA POR MARCA.....	54
TABELA 5 - TEMPO DE PRATELEIRA DOS PRESUNTOS FATIADOS NOS ESTABELECIMENTOS COMERCIAIS POR MARCA.....	56
TABELA 6 – DISTRIBUIÇÃO DAS POSITIVIDADES PARA <i>LISTERIA</i> SPP. ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS DE PRESUNTOS COZIDOS FATIADOS PELO COMÉRCIO VAREJISTA, CONTAGEM DE <i>LISTERIA</i> SPP. E BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....	59
TABELA 7 - FREQUÊNCIAS DAS ESPÉCIES DE <i>LISTERIA</i> ENCONTRADAS NAS CEPAS DE PRESUNTO COZIDO FATIADO INDEPENDENTE DA ORIGEM E TEMPO DE ANÁLISE.....	61
TABELA 8 - CARACTERIZAÇÃO GERAL DAS FREQUÊNCIAS DE <i>LISTERIA</i> SPP. CONSIDERANDO MARCA, ORIGEM E TEMPO DE PRATELEIRA.....	62
TABELA 9 – QUANTIFICAÇÃO DE BAL CONFORME ORIGEM E TEMPO DE PRATELEIRA.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALOA	Ágar Listeria Ottaviani Agosti
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Aw	Atividade de água
BAL	Bactérias Ácido Láticas
C	Citosina
C	Número máximo de amostras positivas
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos
CM	Centímetros
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EAM	Embalagem com atmosfera Modificada
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EU	União Européia (<i>European Union</i>)
G	Guanina
ICMSF	<i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i>
IN	Instrução Normativa
ISO	Organização Internacional de Normalização
LACOMA	Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água
MAPA	Mistério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRS	Ágar Man, Rogosa & Sharpe
n	Universo amostral
NaCl	Cloreto de Sódio
OXA	Ágar Oxford
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonucléico
RTE	<i>Ready-to-Eat</i> – Alimento Prontos para o Consumo

RTIQ	Regulamento Técnico de Identificação e Qualidade
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SIM	Ágar Sulfeto Indol Motilidade
TSA	Ágar Trypticase de Soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por Grama
UV	Ultra Violeta
YE	Extrato de Levedura
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 CARACTERIZAÇÃO DE PRESUNTO	24
3.1.1 Produtos cárneos fatiados – aspectos microbiológicos	24
3.1.2 Tempo de prateleira (<i>shelf life</i>)	26
3.1.3 Legislação para embalagem, rotulagem e validade	28
3.2 <i>LISTERIA</i> SPP.	30
3.2.1 História	30
3.2.2 Filogenia e posição taxonômica	31
3.2.3 Espécies	31
3.2.4 Características morfológicas, metabólicas e bioquímicas	34
3.2.5 <i>Listeria monocytogenes</i>	35
3.2.6 Listeriose	38
3.3 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL)	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 AMOSTRAGEM	42
4.2 AVALIAÇÃO DA AMOSTRA	43
4.3 ANÁLISES LABORATORIAIS	44
4.3.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	44
4.3.1.1 Quantificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	44
4.3.1.2 Verificação da Presença/Ausência de <i>Listeria monocytogenes</i>	45
4.3.2 Confirmação Bioquímica de Espécies de <i>Listeria</i>	47
4.3.2.1 Teste produção de catalase	48
4.3.2.2 Coloração de Gram	48
4.3.2.3 Teste de motilidade	49
4.3.2.4 Teste de hemólise	50
4.3.2.5 Teste de fermentação de açúcares	50
4.3.3 Bactérias Ácido Lácticas (BAL)	51
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54

5.1 EMBALAGEM, ROTULAGEM E VALIDADE.....	54
5.2 <i>LISTERIA</i> SPP.	58
5.2.1 Amostras fatiadas e embaladas na indústria	58
5.2.2 Amostras fatiadas e embaladas no varejo	58
5.2.3 Frequências de <i>Listeria</i> spp.....	61
5.2.4 Associação de presença e ausência de <i>Listeria</i> spp. com a origem, bem como estabelecimento comercial e tempo de prateleira	63
5.2.5 Associação de presença e ausência de <i>Listeria</i> spp. e marca do produto, bem como estabelecimento comercial e tempo de prateleira	63
5.2.6 Relação de contagem de <i>Listeria</i> spp. considerando o tempo de prateleira	64
5.2.7 Relação da contagem de bactérias ácido lácticas considerando o tempo de prateleira	65
5.2.8 Associação entre a quantidade de BAL e a presença e ausência de <i>Listeria</i> spp., considerando o tempo de prateleira.....	66
5.2.9 Associação de quantificação de <i>Listeria</i> spp. entre os estabelecimentos comerciais do varejo, considerando o tempo de prateleira.....	66
6 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICES	80
APÊNDICE 1 – RESULTADOS GERAIS DAS CARACTERIZAÇÕES FENOTÍPICAS	80

1 INTRODUÇÃO

Os tipos de carne mais comumente comercializados no mundo são as carnes suína e de frango, sendo que a de frango vem liderando há décadas o *ranking* de proteína animal. A carne suína tem a sua vantagem pois permite diversificar o processamento, oferecendo grande variedade de produtos sob diversas opções de consumo, ganhando o seu espaço em um mercado de diversificados hábitos alimentares e de alimentos de preparo rápido e fácil (RAMOS; GOMIDE, 2008), como é o caso de presuntos cozidos.

Os consumidores têm se preocupado cada vez mais com as características dos alimentos que consomem e isso tem levado a indústria a desenvolver produtos que além de nutrir também promovam o bem-estar e sejam seguros para o consumo humano (ZANARDI et al., 2010). O apelo da praticidade no preparo, consumo rápido e alimentação saudável colocou em destaque os alimentos prontos para o consumo, *ready-to-eat* (RTE), e o perigo iminente de surtos vinculados por esses tipos de alimentos. Com a globalização do marketing, o crescente comércio internacional, migrações e viagens, a propagação de patógenos perigosos e contaminantes nos alimentos aumentou a vulnerabilidade universal, uma vez que produtos contaminados podem afetar a saúde de inúmeras pessoas ao mesmo tempo em todo o mundo (HAVELAAR et al., 2010).

A carne possui elevado valor nutricional, porém é sensível à deterioração de microrganismos devido à alta quantidade de água livre e pH favorável (ZANARDI et al., 2010). Para reduzir a carga microbiana em alimentos, visando maior durabilidade e segurança, existem vários métodos de conservação como pasteurização, esterilização, cozimento, secagem, evaporação, salga e fermentação. Essas técnicas são muito comuns nas indústrias de alimentos (PEREIRA; VICENTE, 2010).

Existem várias etapas na indústria, dentre elas, a produção, elaboração, armazenamento, transporte e distribuição onde cada uma delas pode servir de porta de entrada para os microrganismos patogênicos. Com a alta capacidade de adaptação, os microrganismos conseguem sobreviver, multiplicar-se e produzir compostos tóxicos nos mais diversos ambientes produtivos. Desta forma, surtos envolvendo patógenos conhecidos ou emergentes, veiculados por alimentos de origem animal ou vegetal, são relatados com frequência (HAVELAAR et al., 2010).

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), resultam da ingestão de alimentos e produtos alimentares contaminados tipicamente por bactérias ou seus metabólitos, parasitas, vírus ou toxinas e substâncias químicas que contaminam os alimentos em diferentes pontos do processo de produção e preparação de alimentos tornando-se um problema de saúde pública mundial (ICMSF, 2006; HAVELAAR et al., 2010; TAUXE et al., 2010).

A importância das diferentes DTA variam entre os países, dependendo dos tipos de alimentos consumidos e a sensibilidade da população. Nos países onde há sistemas de registro de casos de DTA, tem-se verificado aumento significativo, ao longo das últimas décadas, na incidência de doenças causadas pela presença de microrganismos nos alimentos (ICMSF, 2006). Tauxe et al. (2010), sugere que 30 % de todas as novas infecções emergentes globalmente nos últimos 60 anos incluíram agentes patogênicos comumente transmitidos através de alimentos.

No Brasil, o período compreendido entre 2007 a 2017, foram notificados mais de sete mil surtos de DTA, sendo que, em 66,4 % desses surtos o alimento incriminado não foi identificado (MS, 2017). Sabe-se que o número de surtos provavelmente é ainda maior, uma vez que no Brasil e em países em desenvolvimento, a subnotificação e as falhas nas etapas de investigação e dificuldade no diagnóstico comprometem a geração de informação (GERMANO; GERMANO, 2008). Diante disso, a nível mundial, tem-se uma preocupação com a segurança de alimentos, uma vez que os países em desenvolvimento estão cada vez mais produzindo alimentos para um mercado global (NEWELL et al., 2010).

Listeria monocytogenes, tem sido considerado um patógeno emergente desde 1980, devido a casos esporádicos de surtos de Listeriose que foram associados ao consumo de alimentos contaminados (GALVÃO et al., 2012). A *Listeria monocytogenes* é o agente da Listeriose, uma infecção sistêmica grave, de origem alimentar. Embora seja uma doença relativamente rara, pode ser fatal. Acomete, sobretudo, indivíduos imunodeprimidos, gestantes, neonatos e idosos com taxas de mortalidade de 20 a 30 %, sendo comum em pacientes hospitalizados; ocorre em diferentes formas como neuromeningeal, materno-neonatal, gastroenterite febril e, em casos mais graves, pode levar a uma infecção cerebral e até a morte (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2015). Os alimentos normalmente associados com transmissão da doença são aqueles processados industrialmente, com longo tempo de prateleira em

temperatura de refrigeração e prontos para consumo sem cocção prévia como o leite e produtos lácteos, carnes e produtos RTE (LUBER et al., 2011).

Vários tipos de equipamentos e utensílios são utilizados durante o processamento, armazenamento e refrigeração desses tipos de produtos, sob condições que favorecem a contaminação e o crescimento de *Listeria monocytogenes*. Além disso, esse microrganismo é relativamente resistente a variações no pH e nas concentrações de NaCl e, resistente a várias substâncias antimicrobianas; tem capacidade para crescer e sobreviver em temperaturas de refrigeração aumentando, portanto, sua persistência em ambientes de processamento de alimentos (LUBER et al., 2011; GALVÃO et al., 2012; ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2015; BRASILEIRO et al., 2016).

Nos Estados Unidos estima-se que 1.600 pessoas fiquem doentes, a cada ano, devido a contaminação alimentar por *Listeria monocytogenes* com mais de 1.500 hospitalizações e 260 óbitos (16,25%) relacionados; no ano de 2016 ocorreram 24.029 casos de DTA com 5.512 hospitalizações e 98 mortes; desses, 127 casos foram confirmados como infecções por *Listeria monocytogenes* com 123 hospitalizações (97%) e 17 mortes (13,4%); foi o patógeno que apresentou o maior número de hospitalizações e a maior taxa de mortalidade dentre os nove patógenos entéricos comumente transmitidos através de alimentos neste país (CDC, 2017) demonstrando a importância deste microrganismo como fonte de infecção alimentar. Os Estados Unidos são o país que têm a legislação mais rígida para *Listeria monocytogenes* em alimentos RTE, exigindo ausência do microrganismo em 50 g de produto (JAY et al., 2005).

Segundo o último relatório da União Européia (EU) - *European Food Safety Authority* – EFSA (2017), sobre zoonoses, agentes zoonóticos e surtos de origem alimentar, 2.206 casos humanos confirmados de listeriose foram divulgados na EU em 2015, houve um crescimento significativo estatisticamente de listeriose em relação ao período de 2008 a 2014. A taxa de notificação foi de 0,46 casos por 100.000 habitantes, o que foi semelhante a 2014. Em média, 97,4 % dos casos foram hospitalizados. Esta é a maior proporção de casos de hospitalizados sob vigilância da EU. Um total de 270 óbitos (17,7 %) devido a listeriose foram relatadas por 19 Estados Membros em 2015, que foi o maior número de casos fatais relatados desde 2008. Os alimentos envolvidos foram peixes defumados, produtos lácteos (exceto queijos) e produtos à base de carne tratados termicamente.

O Regulamento Europeu (CE) nº 2073/2005 (CE, 2005) estabelece critérios microbiológicos para alguns microrganismos nos alimentos e as regras de execução a serem aplicadas pelas indústrias ao implementar medidas de higiene geral e específica. Para *Listeria monocytogenes*, este regulamento cobre principalmente produtos alimentícios RTE e requer o seguinte: (i) Produtos RTE destinados a lactentes e para fins médicos especiais *Listeria monocytogenes* não deve estar presente em dez amostras (ausência em 25 g); e (ii) Produtos RTE que não sejam para lactentes e propósitos médicos especiais, diferentes critérios microbiológicos aplicam-se dependendo da capacidade do produto quanto ao crescimento de *Listeria monocytogenes*. Assim, para os alimentos RTE não susceptíveis ao crescimento de *Listeria monocytogenes*, os níveis devem ser < 100 unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) ao longo da vida útil do produto (n = 5; c = 0). Por outro lado, nos alimentos RTE que são susceptíveis ao crescimento, *Listeria monocytogenes* não deve estar presente em cinco amostras (ausência em 25 g) no momento da saída da planta de produção, no entanto, se através de estudos de tempo de prateleira, o produto demonstrar que não excederá o limite de 100 UFC/g ao longo de sua vida útil, pode ser comercializado; o limite deve ser <100 UFC/g ao longo da vida útil do produto (n = 5; c = 0). Além disso, este regulamento estabelece que a segurança dos alimentos é de responsabilidade de quem produz, uma vez que a indústria pode investigar o cumprimento dos critérios ao longo da vida útil do produto para avaliar o crescimento de *Listeria monocytogenes* presentes no produto durante a vida útil em condições de estocagem, distribuição, armazenamento e uso.

A legislação brasileira, através da Resolução RDC nº 12 (BRASIL, 2001a), que regulamenta os padrões técnicos microbiológicos para alimentos, estabelece padrões para *Listeria monocytogenes* em apenas alguns tipos de produtos lácteos, como queijos, especificando a ausência do microrganismo em 25 g do produto. Para os demais produtos prontos para o consumo não são contemplados limites específicos para esse microrganismo.

No Brasil, temos relatos de surtos humanos por *Listeria monocytogenes* sem o alimento incriminado. Contudo, esse microrganismo tem sido isolado em vários alimentos (DE MARTINIS et al., 2001). Bersot et al. (2008), chamaram a atenção, em estudo realizado em São Paulo, para o risco microbiológico associado à mortadela fatiada embalada a vácuo. Neste estudo foi observado que 100 % das amostras analisadas foram positivas para *Listeria monocytogenes*. O aumento do consumo de

alimentos prontos para o consumo na sociedade atual, intensifica a exposição humana à *Listeria monocytogenes*, somado a isso, a crescente demanda por produtos com tempo de prateleira longo, que favorece a multiplicação desse microrganismo e, o fato do aumento do segmento da população que é mais suscetível a este microrganismo torna o assunto ainda mais preocupante (IVANEK et al., 2004).

Diante dessa nova realidade e todo contexto epidemiológico, de saúde pública, socioeconômico, tecnológico, diversidade de culturas, diferentes perfis de consumo de alimentos e globalização do mundo atual, no que diz respeito à segurança dos alimentos de origem animal, a indústria de alimentos depara-se com um amplo campo para investigações. A indústria tem buscado atender à crescente demanda dos consumidores por alimentos RTE, frescos, ricos em vitaminas e nutrientes, minimamente processados e seguros além de prevenir prejuízos econômicos relativos à perda de alimentos deteriorados e à transmissão de microrganismos patogênicos ao longo da cadeia de alimentos (GÁLVEZ et al., 2007).

Assim, novas estratégias para conservação de alimentos tem ganhado a atenção, como é o caso da bioconservação, onde a multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes nos alimentos é controlada por metabólitos antimicrobianos produzidos por Bactérias Ácido Láticas (BAL) (MATARAGAS et al., 2003). As bactericinas, metabólitos das BAL, são seguras para o consumo humano, dominam a microbiota natural de muitos alimentos incluindo carne e produtos cárneos, durante o armazenamento, e também são capazes de inibir microrganismos indesejáveis e patogênicos como *Listeria monocytogenes*. A sua importância vem crescendo significativamente devido ao seu potencial como um substituto natural para conservantes químicos (WORAPRAYOTE et al., 2016). A bioconservação pode ser uma alternativa também quando as boas práticas de fabricação, higienização e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), executadas nas indústrias de alimentos não são suficientes para prevenir a presença e inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (DEEGAN et al., 2006).

Em todo esse contexto, merecem destaque para investigação, os produtos cárneos fatiados, como presunto, mortadela, salame e outros, por se tratarem de alimentos prontos para o consumo com sal em sua composição, armazenados sob refrigeração e com riscos de contaminação após processamento por *Listeria monocytogenes*.

Assim, neste trabalho decidiu-se por analisar amostras de presunto cozido por ser um produto nobre, com características intrínsecas que proporcionam o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*, consumido em países desenvolvidos e em países em desenvolvimento, por várias faixas etárias, inclusive por gestantes e pessoas imunodeprimidas; é amplamente comercializado por todo território nacional.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência e quantificar *Listeria monocytogenes* em amostras de presuntos cozidos fatiados na indústria e fatiados no estabelecimento comercial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Confirmar o gênero *Listeria* por meio de testes bioquímicos.

Avaliar as diferenças entre os ambientes de fatiamento (indústria e estabelecimento comercial) quanto a presença/ausência e quantificação de *Listeria monocytogenes*.

Avaliar a ocorrência e quantificação de *Listeria monocytogenes* durante o fatiamento no comércio varejista, comparando os estabelecimentos comerciais onde foram adquiridas as amostras.

Quantificar Bactérias Ácido Láticas (BAL) em amostras de presuntos cozidos fatiados na indústria e fatiados no estabelecimento comercial.

Avaliar o comportamento de *Listeria monocytogenes* e de BAL na aquisição do produto e ao final da vida de prateleira do produto fatiado.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CARACTERIZAÇÃO DE PRESUNTO

Produtos cozidos produzidos a partir da carne suína, como presuntos cozidos, são produtos alimentícios de grande importância econômica. Este grupo de alimento compõe cerca de um quarto de iguarias (*delicatessen*) vendidas na Europa (GEERAERTS et al., 2017).

No Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade - RTIQ (BRASIL, 2000) consta que presunto cozido é o produto cárneo industrializado, obtido exclusivamente dos cortes do membro posterior do suíno (pernil), desossado ou não, adicionados de ingredientes, e submetido a um processo térmico adequado. No caso do membro posterior ser de outra espécie, o produto é denominado de Presunto, seguido do nome da espécie animal de procedência.

O processamento de presunto convencional envolve as seguintes operações: preparo da carne, injeção de salmoura, moagem, tumbleamento, cura por 48 horas em câmara fria a mais ou menos 4 °C, enformagem, cozimento a 80 °C, atingindo cerca de 72 °C internamente, resfriamento, retirada da forma, fatiamento, embalagem, estocagem e expedição (PARDI et al., 2001).

O presunto cozido caracteriza-se por apresentar mínimo de 14 % de proteína bruta, pH entre 5,9 e 6,1 e atividade de água na faixa de 0,91 a 0,97. Esses parâmetros tornam esse tipo de produto muito susceptível à contaminação bacteriana (FAI et al., 2011). Em geral, a composição bacteriana do produto cozido depende das matérias primas utilizadas e da tecnologia de processo e embalagem aplicada (GEERAERTS et al., 2017).

3.1.1 Produtos cárneos fatiados – aspectos microbiológicos

Além de atender as exigências de mercado por produtos com grande praticidade para o consumidor, produtos cárneos comercializados fatiados pelos próprios fabricantes, garantem que, no momento do consumo, os produtos apresentem as características de qualidade esperadas, uma vez que não há nenhuma intermediação, ou seja, não há comprometimento da qualidade dos produtos, viabilizando sua comercialização em estabelecimentos que não dispõem dos

equipamentos e condições e ou conhecimento de boas práticas necessários para o fatiamento (WEISS et al., 2010). Os produtos cárneos fatiados presentes nos estabelecimentos comerciais brasileiro têm entre 30 a 60 dias de validade, variando de acordo com o fabricante, características do produto e temperatura de conservação recomendada na embalagem. A busca por alternativas tecnológicas que permitam uma extensão do tempo de prateleira é uma constante, visando expansão da rede logística onde mercados cada vez mais longínquos possam ser alcançados, garantindo maior número de consumidores com acesso aos benefícios dos produtos cárneos fatiados pelo próprio fabricante. Do ponto de vista logístico, as grandes distâncias entre fábricas, centros de distribuição e pontos de venda, onera os custos, uma vez que a logística necessária precisa ser extremamente eficiente. Grandes estabelecimentos de venda não recebem produtos com mais de um terço do tempo de prateleira do produto já decorrido (ZHU et al., 2014).

Existe uma preferência por parte dos consumidores por produtos fatiados pelas indústrias em relação aos fatiados nos estabelecimentos de venda. Isso se deve ao maior tempo de vida útil do produto que esses produtos oferecem em consequência de melhores condições de higiene durante preparo e embalagem à vácuo ou em atmosfera modificada (WEISS et al., 2010).

Os produtos cárneos cozidos são pouco ácidos ($\text{pH} > 6$), apresentam alta atividade de água (0,98 a 0,99) e, geralmente, baixo teor de sal ($< 2\%$). Essas características não impedem a multiplicação de bactérias deteriorantes (MATARAGAS et al., 2003). A etapa de fatiamento destes produtos aumenta o risco de contaminação microbiana devido a manipulação, a maior superfície de contato do produto com o ar, equipamentos e manipuladores e o contato do produto com superfícies que muitas vezes estão inadequadamente higienizadas. Aliado a isso, a falta de microrganismos competidores devido ao processo de cozimento favorece a multiplicação dos microrganismos decorrentes da contaminação pós-processamento (GÁLVEZ et al., 2007; KAPETANAKOU et al., 2016).

Segundo Luber et al. (2011), além da dificuldade relacionada com o tempo de prateleira, há também a dificuldade relacionada com a inocuidade de produtos fatiados. Em um estudo de risco realizado nos Estados Unidos indicou que produtos cárneos fatiados, especialmente aqueles fatiados nos estabelecimentos de venda, são o alimento com maior risco de contaminação por *Listeria monocytogenes*. Araújo et al. (2002), analisaram 40 amostras de carne de peru, divididas em quatro grupos de

dez sendo: *blanquet* inteiro, *blanquet* fatiado, presunto inteiro e presunto fatiado. Esses autores verificaram uma alta incidência de bactérias do gênero *Listeria*, sendo 80% em *blanquet* fatiado e 90 % em presunto fatiado, contrastando com a ausência nas peças inteiras. A ausência de *Listeria* nos produtos inteiros e sua alta ocorrência nos fatiados sugerem provável manipulação inadequada dos produtos no momento do fatiamento, o que indica necessidade de melhorar o controle higiênico durante o processamento.

3.1.2 Tempo de prateleira (*shelf life*)

O tempo de prateleira de produtos cárneos cozidos, como o presunto, é limitada principalmente por segurança microbiológica e deterioração. Isso ocorre por se tratar de um produto manipulado após o processo de cozimento, ou seja, durante as etapas de fatiamento e empacotamento microrganismos podem ser incorporados ao produto. Além disso, trata-se de um produto com pH perto de 6 e atividade de água acima de 0,94 (VERCAMMEN et al., 2011).

A definição para validade comercial ou tempo de prateleira, para carnes e produtos cárneos, pode ser definida como o período entre a fabricação e a compra no varejo de um produto alimentício, durante o qual o produto é de qualidade satisfatória, ou seja, é o tempo de armazenamento até a sua deterioração (BRESSAN et al., 2007). Este prazo comercial depende da interação de vários fatores como intrínsecos, extrínsecos, de boas práticas de higiene, controle de distribuição, temperatura de armazenamento e tipo de embalagem, sendo ainda dependente do número, tipo e taxa de crescimento dos microrganismos que podem estar presentes nos alimentos (VERCAMMEN et al., 2011).

A deterioração se dá por alterações físicas e químicas que modificam a aparência do alimento, tornando-o repugnante ao consumo ao olho nu, ou ainda, devido a odores desagradáveis, conhecidos por *off-flavours*. Somado aos aspectos físicos e químicos do produto, o ponto de deterioração pode ser definido também pela contagem bacteriana máxima aceitável (BRESSAN et al., 2007). Segundo Vercammen et al. (2011), a deterioração do presunto fatiado embalado é acompanhado de acúmulo de exsudatos viscoso e inchaço da embalagem devido a formação de gás que, geralmente, é causado por bactérias. No que diz respeito a segurança microbiológica, a contaminação com agentes patogênicos como

Escherichia coli O157:H7 ou *Salmonella* é uma preocupação, mas o risco mais importante é, sem dúvida, *Listeria monocytogenes*, devido à ampla distribuição ambiental e capacidade de crescimento em produtos refrigerados.

Os produtos curados possuem validade comercial maior que as carnes frescas devido ao efeito inibidor do sal, nitrito e fumaça. A presença do açúcar em carnes curadas facilita as reações fermentativas e atrasa as mudanças proteolíticas indesejáveis (GEERAERTS et al., 2017). Produtos cárneos cozidos e curados são produtos refrigerados, economicamente importantes, com elevado consumo em países europeus. Como essas matrizes alimentícias são aquecidas a temperaturas de 65 a 75 °C, a maioria das células vegetativas são mortas e a contaminação pós aquecimento é o que determina a validade comercial (VERMEIREN et al., 2004).

Produtos fatiados possuem um agravante a mais que influencia na redução do tempo de prateleira do produto, como a excessiva manipulação e a maior superfície de contato com o oxigênio, favorecendo a oxidação lipídica e a contaminação do alimento por microrganismos aeróbios deteriorantes ou patogênicos. Assim, muitas indústrias, na tentativa de minimizar este problema, comercializam produtos fatiados acondicionados em embalagens a vácuo ou em atmosfera modificada (BRESSAN et al., 2007).

A embalagem é de extrema importância na proteção dos alimentos, pois preserva a qualidade dos produtos e protege contra o vapor de água, oxigênio e outros gases, luz, poeira e outras sujidades, perda de peso, danos mecânicos e, ainda, preveni a entrada de microrganismos e insetos. No interior das embalagens, os fatores usuais que determinam o crescimento e a atividade dos microrganismos são o próprio alimento, a temperatura, a atividade de água, o pH, a mistura gasosa e a microbiota competitiva (BRESSAN et al., 2007).

A embalagem a vácuo, empregado no acondicionamento tanto de peças inteiras como de pequenas porções, tem como objetivo proteger o produto cárneo do contato com o oxigênio do ar. O oxigênio favorece o crescimento de microrganismos aeróbios de alto potencial de deterioração, que alteram o odor, a cor e a aparência dos produtos cárneos, acarreta na rancidez oxidativa das gorduras, causa alterações nos pigmentos da carne e destrói algumas vitaminas e aromas. Na ausência de oxigênio, as bactérias lácticas predominam e causam menor alteração na qualidade das carnes, mesmo em altas contagens (BRESSAN et al., 2007).

A tecnologia de embalagem com atmosfera modificada (EAM) tem como propósito aumentar a validade comercial, melhorar a aparência e a apresentação do produto, reduzir o uso de conservantes artificiais, minimizar perdas e otimizar as cadeias de produção e distribuição. Nessa tecnologia, os sistemas de acondicionamento em atmosfera modificada são concebidos para efetuar a troca da atmosfera original ao redor do produto por uma mistura de gases, de modo a prever e exercer controle sobre as alterações que ocorrerão no produto, na embalagem e na própria atmosfera gasosa, em decorrência da interação dos gases com o produto. O objetivo principal da modificação da atmosfera é preservar o frescor do produto do primeiro dia de processamento e estender o prazo de manutenção desse frescor e os atributos de qualidade durante sua vida útil maior (BRESSAN et al., 2007). De acordo com Mano et al. (2002), os gases mais comumente utilizados são: o gás carbônico, devido a sua atividade antimicrobiana, é o que compõe a maior parte da mistura de gases, e o nitrogênio, que é usado apenas para completar o espaço disponível. O sucesso da aplicação da tecnologia de EAM está associado a cinco elementos: especificidade da mistura gasosa em relação ao produto; natureza e qualidade inicial do produto fresco; temperatura de armazenamento; propriedades de barreira da embalagem, e eficiência do equipamento de acondicionamento.

Para Luber et al. (2011), a etapa de fatiamento deve ser considerada um ponto crítico de controle, pois submete produtos que atendem a uma expressiva parcela da população, como os produtos fatiados em supermercados, à manipulação excessiva e ao risco de contaminação cruzada, na mesma ordem do ambiente industrial. Além disso, produtos fatiados geralmente não são tratados termicamente após a comercialização, sendo destinados ao pronto consumo. Este fato exige da cadeia produtora e distribuidora de alimentos a garantia de atendimento aos parâmetros microbiológicos até o momento do consumo.

3.1.3 Legislação para embalagem, rotulagem e validade

As legislações vigentes em âmbito nacional hoje são inúmeras, destacam-se o Código de Defesa do Consumidor (BRASIL, 1990) que traz como direito básico do consumidor a informação adequada e clara sobre os diferentes produtos e serviços, com especificação correta de quantidade, características, composição, qualidade e preço, bem como sobre os riscos que apresentem e, determina que as empresas

devem seguir os padrões de qualidade e as especificações de quantidade expressos nos rótulos de seus produtos, e que violações a esses padrões tornam o produto impróprio ou inadequado ao consumo.

A Instrução Normativa nº 22 (BRASIL, 2005), que é específica para produtos de origem animal, define como embalagem o recipiente ou pacote destinado a garantir a conservação e facilitar o transporte e manuseio dos produtos de origem animal e, rotulagem ou rótulo como sendo toda inscrição, legenda ou imagem impressa ou colada sobre a embalagem do produto de origem animal. Essa legislação traz como informações obrigatórias, entre outras, a denominação de venda do produto de origem animal, conteúdo líquido, identificação de origem (nome, endereço, Cadastro Nacional da Pessoa Jurídica, carimbo do Serviço de Inspeção Federal - SIF, categoria oficial do estabelecimento, número do registro do produto), identificação de lote, data de fabricação e de validade, instruções sobre conservação e composição do produto.

A Resolução RDC nº 360 (BRASIL, 2003c) institui a obrigatoriedade de constar a informação nutricional no rótulo dos produtos cárneos, quando estas forem embaladas na indústria não sendo aplicado aos produtos fracionados nos pontos de vendas a varejo, comercializados como pré medidos como é o caso dos presuntos fatiados nos supermercados.

Já a Resolução RDC nº 216 (BRASIL, 2004), estabelece procedimentos de boas práticas para serviços de alimentação a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado. Essa legislação define serviços de alimentação, estabelecimentos que realizam, entre outras atividades, o fracionamento, armazenamento e exposição à venda e, define como alimento preparado os alimentos manipulados e preparados em serviços de alimentação, expostos à venda embalados ou não. Esta resolução determina medidas com o intuito de minimizar o risco de contaminação cruzada, como evitar o contato direto ou indireto entre alimentos crus, semi-preparados e RTE; lavagem e antisepsia das mãos dos manipuladores antes do manuseio do alimento preparado; as matéria primas e os ingredientes devem ser expostos à temperatura ambiente somente pelo tempo mínimo necessário para o fatiamento e quando as matérias-primas e os ingredientes não forem utilizados em sua totalidade, devem ser adequadamente acondicionados e identificados com, no mínimo, as seguintes informações: designação do produto, data de fracionamento e prazo de validade após a abertura ou retirada da embalagem original.

Um ponto importante a se considerar na Resolução RDC nº 216 (BRASIL, 2004), é a informação do prazo máximo de consumo do alimento preparado e conservado sob refrigeração a temperatura de 4°C, ou inferior, deve ser de 5 dias. Quando forem utilizadas temperaturas superiores a 4°C e inferiores a 5°C, o prazo de consumo deve ser reduzido, de forma a garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento.

Ainda sobre validade, segundo a Instrução Normativa nº 22 (BRASIL, 2005), a validade e as informações sobre conservação doméstica são de responsabilidade da empresa; onde devem constar nos rótulos das embalagens de produtos de origem animal, que exijam condições especiais para a sua conservação, deve ser incluída uma legenda com caracteres bem legíveis, indicando as precauções necessárias para manter as características normais, devendo ser indicadas as temperaturas máxima e mínima para a conservação do produto e o tempo que o fabricante, produtor ou fracionador garanta sua durabilidade nessas condições. O mesmo dispositivo é aplicado para produtos de origem animal que pode se alterar depois de abertas suas embalagens originais como é o caso das peças inteiras de presuntos fracionadas nos supermercados.

Em âmbito estadual temos instruções específicas de cada Estado que não comprometem ou contradizem as legislações de âmbito federal, apenas as complementam. A Fiscalização para o atendimento de todas essas normas é de competência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e também da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cada uma no seu campo de atuação.

3.2 *LISTERIA* SPP.

3.2.1 História

Segundo Cruz et al. (2008), uma bactéria há muito já conhecida dos cientistas, *Listeria monocytogenes* vem atraindo estudos desde que Murray, Webb e Swann relataram, em 1924, o primeiro isolamento de um microrganismo que foi responsável por uma leucocitose mononuclear típica em coelhos, denominando-o de *Bacterium monocytogenes* (MURRAY et al., 1926). Já em 1930, Pirie, isolou um microrganismo muito semelhante em roedores e o denominou de *Listerella hepatolytica*, nome em

homenagem ao cirurgião britânico, Lord Joseph Lister. *Listeria monocytogenes*, só foi denominada assim, em 1940 e, somente em 1948 foi incluída no Manual Bacteriológico Determinativo de Bergey (BREED et al., 1948).

3.2.2 Filogenia e posição taxonômica

Com a introdução e desenvolvimento de novas técnicas moleculares e genéticas, a posição filogenética do gênero *Listeria* tem sido esclarecida. Através da taxonomia numérica, Feresu e Jones (1988) distinguiram a posição do gênero *Listeria* com a de outros gêneros e a aproximaram-na dos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Mais tarde, Collins et al. (1991), consideraram que o gênero *Listeria* era filogeneticamente afastado do gênero *Lactobacillus* através de sequenciamento de RNA (Ácido Ribonucleico) ribossômico 23S, onde o gênero *Listeria* apresentava uma proximidade elevada com os gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus* (SALLEN et al., 1996). O baixo percentual de Guanina mais Citosina (G + C) no DNA (Ácido Desoxirribonucleico), < 55 %, de *Listeria monocytogenes* indicava a proximidade ao grupo de gêneros como *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*, pertencentes à classe *Bacilli* (BARBUDDHE et al., 2008). Com base no sequenciamento de RNA ribossômico 16S (e de outros genes), os membros do gênero *Brochothrix* são os mais próximos do gênero *Listeria* (LUDWIG et al., 2009). Assim, a classificação taxonômica do gênero *Listeria* apresenta-se da seguinte forma: filo *Fimicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Bacillales*, família *Listeriaceae*, gênero *Listeria*.

3.2.3 Espécies

Até 1948, *L. monocytogenes* era a única espécie reconhecida do gênero *Listeria*. Antes de 1985, já tinham descritas, ao total, seis espécies – *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. grayi* - denominadas como os gêneros “clássicos” de *Listeria* spp., isoladas de alimentos. As espécies isoladas variavam de acordo com o tipo de alimento e a metodologia de detecção utilizada, embora *L. innocua* e *L. monocytogenes* serem as mais frequentemente isoladas (BARRE et al., 2016).

Recentemente, identificaram-se 11 espécies novas do gênero *Listeria*, isoladas de alimentos e outros nichos ambientais ao redor do mundo, incluindo

ambientes agrícolas e naturais – *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. fleischmannii*, *L. aquatica*, *L. floridensis*, *L. newyorkensis* e *L. Booriae* (GRAVES et al., 2010; LECLERCQ et al., 2010; SAUDERS et al., 2012; BERTSCH et al., 2013; HALTER et al., 2013; DEN BAKKER et al., 2014; WELLER et al., 2015). Assim, o gênero *Listeria* contém 17 espécies (ORSI; WIEDMANN, 2016). Recentemente Leclercq et al. (2016), propôs incluir uma nova espécie no gênero *Listeria*, *L. Thailandensis*, que foi isolado de produtos de frango frito na Tailândia.

Orsi e Wiedmann (2016), propuseram, baseados em dados de análises moleculares (genotípicos) e fenotípicos a divisão do gênero *Listeria* em dois grupos. Um grupo distinto de 6 espécies, denominado de *Listeria sensu stricto*, que compartilham características fenotípicas comuns como a capacidade de crescimento a baixa temperatura com motilidade flagelar, neste grupo encontra-se o patógeno *L. monocytogenes*; e um segundo grupo com 11 espécies, denominado de *Listeria sensu lato*, que segundo proposto por Orsi e Wiedmann (2016), representam três grupos monofiléticos distintos, o que pode justificar a reclassificação de *Listeria sensu lato* em 3 novos gêneros. Esses três gêneros separados propostos – *Murrraya*, *Mesolisteria* e *Paenilisteria*, não contém agentes patogênicos, não são móveis (exceto *L. grayi*), não são capazes de reduzir o nitrato (exceto *L. floridensis*) e são negativos para o teste de Voges-Proskauer (exceto *L. grayi*). As espécies do novo gênero proposto, *Mesolisteria*, não podem crescer abaixo de 7 °C. A esquematização das novas espécies de *Listeria* divididas em grupos estão na TABELA 1.

Dentre as 17 espécies de *Listeria*, apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas patogênicas. *L. monocytogenes* é patogênica para o homem e, é o agente causador da listeriose, uma das mais severas infecções alimentares. Essa infecção alimentar aparece como a terceira principal causa de óbitos nos Estados Unidos. Os casos de doenças e surtos causados por este microrganismo têm um impacto econômico considerável para a sociedade e para indústria de alimentos (IVANEK et al., 2004; ORSI; WIEDMANN, 2016; AMAJOURD et al., 2017).

Atualmente, a disponibilidade de métodos moleculares, especialmente o sequenciamento, para a caracterização rápida de *Listeria* spp. proporcionará à identificação futura de isolados que representem essas novas espécies em diferentes fontes e ao redor do mundo assim como possíveis espécies novas (ORSI; WIEDMANN, 2016; BARRE et al. 2016).

Segundo Amajoud et al. (2017), a descoberta e identificação de novas espécies permite uma melhor compreensão da evolução das características, comportamento e da virulência do gênero *Listeria* tendo aplicação prática na indústria de alimentos para detectar a presença, persistência e crescimento desse microrganismo.

TABELA 1 – ESPÉCIES “NOVAS” E “CLÁSSICAS” DO GÊNERO *LISTERIA* DIVIDIDAS EM DOIS GRANDES GRUPOS E EM TRÊS GÊNEROS CONFORME PROPOSTO POR ORSI E WIEDMANN (2016)

GRUPOS	<i>Listeria</i> spp.	GÊNEROS “NOVOS”	REFERÊNCIA
<i>Listeria sensu stricto</i>			
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria</i>	Murray et al. (1926)
	<i>L. ivanovii</i>	<i>Listeria</i>	Seeliger et al. (1984)
	<i>L. seeligeri</i>	<i>Listeria</i>	Rocourt; Grimont (1983)
	<i>L. innocua</i>	<i>Listeria</i>	Seeliger (1983)
	<i>L. welshimeri</i>	<i>Listeria</i>	Rocourt; Grimont (1983)
	<i>L. marthii</i>	<i>Listeria</i>	Graves et al. (2010)
<i>Listeria sensu lato</i>			
	<i>L. grayi</i>	<i>Murraya</i>	Errebo Larsen; Seeliger (1966)
	<i>L. fleischmannii</i>	<i>Mesolisteria</i>	Bertsch et al. (2013)
	<i>L. aquatica</i>	<i>Mesolisteria</i>	Den Bakker et al. (2014)
	<i>L. floridensis</i>	<i>Mesolisteria</i>	Den Bakker et al. (2014)
	<i>L. weihenstephanensis</i>	<i>Paenilisteria</i>	Lang Halter et al. (2013)
	<i>L. rocourtiae</i>	<i>Paenilisteria</i>	Leclercq et al. (2010)
	<i>L. cornellensis</i>	<i>Paenilisteria</i>	Den Bakker et al. (2014)
	<i>L. riparia</i>	<i>Paenilisteria</i>	Den Bakker et al. (2014)
	<i>L. grandensis</i>	<i>Paenilisteria</i>	Den Bakker et al. (2014)
	<i>L. booriae</i>	<i>Paenilisteria</i>	Weller et al. (2015)
	<i>L. newyorkensis</i>	<i>Paenilisteria</i>	Weller et al. (2015)
Total (gênero <i>Listeria</i>)	17		

3.2.4 Características morfológicas, metabólicas e bioquímicas

Listeria spp. são bastonetes gram positivos pequenos, com 0,4 a 05 µm de diâmetro e 1 a 2 µm de comprimento, com extremidades arredondadas. As células são encontradas em unidades isoladas ou em cadeias curtas, podendo aparecer em arranjos em formas de “V”, “Y” ou paliçada e não produzem esporos ou cápsulas. São catalase positivos e produtores de ácido láctico a partir da glicose e outros açúcares. A bactéria é móvel por poucos flagelos peritríquios quando cultivada entre 20 e 25 °C, porém é imóvel ao apresentar fraca motilidade a 37 °C. O seu cultivo em meio semissólido resulta em crescimento com forma característica de “guarda-chuva” e aproximadamente 0,5 cm a baixo da superfície do meio, devido à natureza microaerófila e ou anaeróbia facultativa (JAY et al., 2005; ROCOURT; BUCHRIESER, 2007).

O gênero *Listeria* apresenta uma característica ubiqüitária, ou seja, estão em todos os lugares, urbanos e vastamente distribuído na natureza, têm sido isoladas do solo, vegetais em decomposição, ambientes úmidos, vegetação, silagem, esgoto, água, resíduos de abatedouros e, alguns alimentos como carnes, leite cru, queijos, frutos do mar, frutas e legumes (GILOT; CONTENT, 2002; JAY et al., 2005; SAUDERS et al., 2012; LOKERSE et al., 2016; AMAJOURD et al., 2017). Além desses ambientes, *L. monocytogenes* tem sido encontrada em hortaliças e material fecal de várias espécies de mamíferos, aves e peixes, em geral portadores assintomáticos, que liberam a bactéria nas fezes. O solo e os vegetais em decomposição são os principais reservatórios da bactéria (RYSER; DONNELT, 2001). Isso explica o fato de *L. monocytogenes* ser facilmente encontrada em alimentos de origem animal e vegetal, *in natura* ou processados, incluindo leite e derivados. Apesar da ampla distribuição na natureza, *L. monocytogenes* e outras *Listeria* spp. ocorrem em baixa população na maioria dos *habitats* naturais. Ambientes naturais e de indústria de alimentos podem ser fontes de linhagens patogênicas de *L. monocytogenes*, mas é improvável que sejam fontes diretas de infecção humana (SAUDERS et al., 2012).

Segundo estudo de prevalência de *Listeria* spp. em ambientes naturais e urbanos realizado por Sauders et al. (2012), *Listeria* spp. apresentou prevalências semelhantes em amostras de ambientes naturais (23,4%) e urbanos (22,3%). Enquanto *L. seeligeri* e *L. welshimeri* estavam significativamente associados a

ambientes naturais ($P \leq 0.0001$), *L. innocua* e *L. monocytogenes* estavam significativamente associados a ambientes urbanos ($P \leq 0.0001$).

Embora *L. monocytogenes* seja considerado um patógeno humano e animal (mamíferos), e, *L. ivanovii* patogênico aos animais, (IVANEK et al., 2004; GRAVES et al., 2010; ORSI; WIEDMANN, 2016; AMAJOURD et al., 2017); existem estudos que relatam a infecção de humanos ocasionadas por *L. seeligeri* (GILOT; CONTENT, 2002), *L. ivanovii* (GILOT; CONTENT, 2002;), *L. grayi* (TODESCHINI et al., 1998) e *L. innocua* (KARLI et al., 2014).

As espécies são diferenciadas, fenotipicamente, basicamente conforme alguns testes bioquímicos, mostrados na TABELA 2, como motilidade, β -hemólise e fermentação de açúcares.

TABELA 2 – ALGUMAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE ESPÉCIES DE LISTERIA

<i>Listeria</i> spp.	Motilidade	β -hemólise	Xilose	Ramnose	Dextrose	Manitol
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	V!	-
<i>L. marthii</i>	+	-	-	-	V!	-
<i>L. innocua</i>	+	-	-	V	V!	-
<i>L. welshimeri</i>	+	-	+	V	+	-
<i>L. ivanovii</i>	+	+	+	-	V!	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	+	-	+	-
<i>L. grayi</i>	+	-	-	-	+	+

+ positivo, - negativo, V varia entre replicações ou cepas, V! varia entre estudos

FONTE: Adaptado Orsi; Wiedmann (2016)

3.2.5 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes diferencia-se de outros patógenos causadores de doenças de origem alimentar pela capacidade de se multiplicar em uma ampla faixa de temperatura, de 0 a 45 °C, e de pH, de 4,1 a 9,6, podendo sobreviver nos alimentos por um longo período de tempo; também tem a capacidade de se multiplicar em altas concentrações de sal (NaCl), 10 %, e de sobreviver em concentrações ainda maiores; além de crescer em condições de atividade de água (a_w) de 0,90 a 0,97. Por apresentar essas características de sobreviver e crescer em condições adversas, como temperatura de refrigeração, pH baixo e altas concentrações de sal, a contaminação por *L. monocytogenes* em alimentos RTE, como é o caso do presunto fatiado, é uma importante preocupação com a saúde pública, uma vez que esses

produtos são comumente consumidos sem um cozimento e ou reaquecimento prévio pelo consumidor e que podem haver contaminação cruzada na indústria pós tratamento térmico nas etapas de fatiamento, pesagem e embalagem (FRIEDLY et al., 2008). Justamente por ser uma preocupação significativa com a saúde, as agências reguladoras do Estados Unidos estabeleceram uma política de “tolerância zero” para este microrganismo em alimentos RTE (FRIEDLY et al., 2008; MARTINS; LEAL GERMANO, 2011; AHMED et al., 2015). Essa política abriu portas para o uso de agentes antimicrobianos para controle de *L. monocytogenes* em produtos de carne ou aves de capoeira RTE (carnes RTE) (AHMED et al., 2015).

Assim, segundo Friedly et al. (2008), a contaminação cruzada ou a recontaminação após o processo térmico nas indústrias é de grande preocupação, mesmo se forem seguidos os procedimentos adequados do programa de APPCC e os protocolos de tratamento térmico. Assim programas como o APPCC e os de pré-requisitos, como os programas de higienização e boas práticas de processamento e manipulação, devem controlar esse risco. O plano APPCC deve comprovar a sua eficácia e deve ser validado através de estudos. Segundo Keskinen et al. (2008), um fator que contribui para a contaminação de plantas processadoras de alimentos com *L. monocytogenes* é a capacidade de formar biofilmes, mesmo em condições desfavoráveis, tornando possível a aderência a objetos inertes.

A formação de biofilmes no ambiente de processamento é uma preocupação importante porque é uma fonte de possível contaminação residual de contato. Nas últimas décadas, tornou-se cada vez mais claro que bactérias, incluindo patógenos transmitidos por alimentos, juntamente com bactérias comuns de deterioração da carne, como *Pseudomonas* spp. e *Lactobacillus* spp. crescem predominantemente como biofilmes nas superfícies, na maioria de seus *habitats*, em vez de no modo planctônico. O biofilme pode ser definido como uma comunidade séssil sedimentada microbialmente caracterizada por células que estão ligadas a um substrato ou interface ou uma à outra, incorporadas em uma matriz autoproduzida que consiste em polissacarídeos. A formação de biofilmes aumenta a capacidade dos microrganismos sobreviver a tensões que são encontradas em um ambiente industrial como, por exemplo, refrigeração, acidez, salinidade, desinfecção, uma vez que, as células microbianas possuem, nessa condição de biofilme, uma proteção extra contra dessecação, luz ultravioleta (UV), antimicrobianos e agentes higienizantes. Na indústria da carne, os biofilmes formados por microrganismos patogênicos e aquelas

responsáveis pela deterioração dos alimentos, podem criar uma fonte persistente da contaminação do produto levando a sérios problemas de higiene e perdas econômicas (GIAOURIS et al., 2014; ABEYSUNDARA et al. 2017; KOCOT; OLSZEWSKA, 2017). Keskinen et al. (2008), relataram estudos que mostraram que *L. monocytogenes* é capaz de se transferir rapidamente tanto da lâmina de fatiamento para o produto quanto do produto para a lâmina de fatiamento.

Outro problema é a resistência a antibióticos como ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina e cloranfenicol que *L. monocytogenes* apresenta. Essa resistência, pode ser causada pelo uso excessivo e inadequado de antibióticos (GIAOURIS et al., 2014; TAHOUN et al., 2017).

Linhagens de *L. monocytogenes* se diferenciam com base em determinantes antigênicos expressos na superfície do microrganismo; são divididas em sorotipos baseados em antígenos somáticos (O) e flagelares (H) identificados por sorotipagem onde reações de aglutinação com antissoros específicos diferenciam os antígenos da superfície celular. Foram identificados 12 sorotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d e 7. No entanto, pelo menos 95 % das cepas isoladas de pacientes que sofreram intoxicação alimentar de alimentos contaminados são sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, e 4b, enquanto os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b são mais relevantes para doença humana. O sorotipo 4b é isolado principalmente de surtos, enquanto os sorotipos 1/2a e 1/2b são associados a casos esporádicos (MARTINS; LEAL GERMANO, 2011; ABEYSUNDARA et al., 2017).

Os genes de virulência, que desempenham um papel significativo na patogenicidade de *L. monocytogenes* incluem a listeriolissina O (codificada por hlyA), internalina (codificado por inlA, inlC e inlJ), regulador de virulência (codificado por prfA), montagem de actina (codificado por actA), fosfatidilinositol-fosfolipase C (codificada por plcA) e proteína associada à invasão (codificada por iap). A presença de inlC e inlJ aumenta a virulência potencial e, portanto, a diferenciação de cepas potencialmente virulentas a partir de estirpes avirulentas pode ser alcançada pela caracterização de mais de um gene de virulência. Para o rastreamento de fontes de contaminação por *L. monocytogenes*, várias técnicas de tipagem foram desenvolvidas, porém a técnica considerada padrão ouro para subtipo de *L. monocytogenes* é a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (TAHOUN et al., 2017). PFGE é um método genotípico altamente reproduzível, discriminatório e efetivo

que consegue distinguir estirpes muito próximas que são indistinguíveis por outros métodos de tipificação (GRAVES et al., 2010).

Nos Estados Unidos, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention* - CDC) estabeleceu uma rede Internacional (PulseNet) de saúde pública e de laboratórios de alimentos que rotineiramente realizam análises ao subtipo de bactérias patogênicas isoladas nos alimentos. Os laboratórios PulseNet utilizam protocolos altamente padronizados de PFGE e são capazes de comparar rapidamente pulsotipos de bactérias de vários pontos do país através da Internet. A análise rotineira de subtipos de *L. monocytogenes* permite que os investigadores detectem e investiguem mais rapidamente surtos de listeriose (CDC, 2017).

L. monocytogenes tem sido considerada como um patógeno de mais de 50 mamíferos, incluindo humanos, aves silvestres, peixes e crustáceos, caracterizando que a transmissão zoonótica é relevante. Não pode ser descartada a possibilidade de animais e humanos saudáveis serem portadores da bactéria (JAY, 2005).

3.2.6 Listeriose

Listeriose é uma infecção sistêmica grave, rara mas pode ser fatal, de origem alimentar associada a *Listeria monocytogenes*. Acomete, sobretudo, indivíduos imunodeprimidos, gestantes, neonatos e idosos com taxas de mortalidade de 20 a 30 %, sendo comum pacientes hospitalizados; ocorre em diferentes formas como neuromeningeal, materno-neonatal, gastroenterite febril e, em casos mais graves, pode levar a uma infecção cerebral e até a morte (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2015). Os alimentos normalmente associados com transmissão da doença são aqueles processados industrialmente, com longo tempo de prateleira em temperatura de refrigeração e prontos para consumo sem cocção prévia como o leite e produtos lácteos, carnes e produtos RTE (LUBER et al., 2011).

Existem duas formas de listeriose associadas com *L. monocytogenes*: não invasiva e invasiva. A forma não invasiva é a mais branda e se apresenta como uma gripe e ou uma doença gastrointestinal autolimitada, caracterizada pelo desenvolvimento de febre, diarreia, náusea, vômito, dor de cabeça e mialgia; ocorre dentro de 12 a 24 horas após a exposição. Já a forma invasiva da doença, ocorre principalmente em pessoas do grupo de risco e ao contrário de outras infecções

alimentares, a listeriose invasiva não provoca sintomas gastrointestinais em humanos. Uma vez ingeridas, *L. monocytogenes* invadem o epitélio gastrointestinal, passam para a corrente sanguínea, podendo infectar órgãos como fígado, baço e sistema linfático. Pode atravessar a barreira da placenta e infectar o feto, levando a parto prematuro, natimortos e ou abortos. A natureza invasiva desse microrganismo leva a condições fatais, como sepse, encefalites e meningites. Podem incluir outras infecções como endocardite, peritonite, pneumonia e osteomielite (NEWELL et al., 2010; LUBER et al., 2011).

O período de incubação da listeriose, desde a exposição até o aparecimento da sintomatologia, é muito variável, podendo ocorrer de 1 a 90 dias, o que torna a identificação do patógeno e o rastreamento da fonte de alimentos contaminados muito difícil. A dose infectante de *L. monocytogenes* para humanos não está claramente estabelecida, podendo variar de acordo com as condições imunitárias do hospedeiro e à variabilidade na virulência do patógeno. Outra dificuldade de se estabelecer a dose infectante, está no fato do longo período de incubação da doença e nesse tempo poder haver multiplicação, morte ou injúria do microrganismo no alimento incriminado ou até não haver mais o alimento disponível para pesquisa do patógeno (MARTINS; LEAL GERMANO, 2011). Dados coletados em surtos de listeriose sugerem que os alimentos incriminados continham contagens elevadas de *L. monocytogenes*, cerca de 10^6 UFC/g o que realça a necessidade de minimizar a exposição humana a altas populações do microrganismo. Contagem inferiores a 10^2 UFC/g em alimentos não são infectantes, mas não excluem essa possibilidade. Assume-se que menos do que mil células possam causar a doença em populações susceptíveis (FDA/FSIS, 2003).

O primeiro caso identificado de listeriose de origem alimentar ocorreu em 1981, envolvendo salada de repolho tipo *coleslaw*. Desde então, numerosos surtos envolvendo diferentes tipos de alimentos foram identificados. Em 2011, melões contaminados com *L. monocytogenes* causaram o surto com maior mortalidade ocorrido nos Estados Unidos nos últimos 90 anos com 33 mortes e um aborto (CDC, 2012).

3.3 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL)

As bactérias ácido lácticas (BAL) são um grande grupo de microrganismos naturalmente encontrados em alimentos. Os mais importantes gêneros de BAL são o

Lactobacillus, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella*. As BAL são microrganismos sob a forma de cocos ou bacilos Gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos, anaeróbios e aerotolerantes, não redutoras de nitrato a nitrito, resistem bem a ambientes ácidos e com concentrações relativamente altas de sal e têm como produto da fermentação de açúcares, principalmente, o ácido láctico. Estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser encontradas na água, em solos, plantas, no trato intestinal de animais e humanos, sendo, conseqüentemente, encontradas em diferentes produtos alimentares como fermentados, carnes, derivados lácteos, vegetais, bebidas (LIU, 2003; GANZLE, 2015).

As BAL podem ser classificadas de acordo com a sua temperatura de crescimento em mesófilicas e termofílicas. As mesofílicas crescem a uma temperatura ótima por volta de 30 °C e, as termofílicas crescem a uma temperatura ótima de 42 °C (CHARLIER et al., 2009).

É muito comum o uso dessas bactérias como culturas *starter* ou iniciadoras na produção de alimentos fermentados como queijos, leites fermentados, iogurtes, vinho, pães, conservas vegetais entre outros, nos quais contribuem para o desenvolvimento de características sensoriais diferenciais desses produtos como aroma, textura e *flavour*, isso se dá devido à sua capacidade fermentativa (CHARLIER et al., 2009). Além de seu uso pelas indústrias de alimentos na fabricação de produtos fermentados, também são utilizadas como ferramenta para melhorar a segurança microbiológica e ou para estender o tempo de prateleira dos produtos. Isso porque inibem microrganismos deteriorantes e patógenos alimentares por meio da competição com os mesmos por nutrientes ou pela produção de substâncias com atividade antimicrobiana como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, ácidos graxos de cadeia curta, diacetil e bacteriocinas (DEEGAN et al., 2006; GÁLVEZ et al., 2007).

As bacteriocinas são pequenos peptídeos catiônicos, termoestáveis, sintetizados nos ribossomos das bactérias e que possuem atividade antimicrobiana, não tendo atividade contra as bactérias que as produziram. As bacteriocinas variam consideravelmente em peso molecular, propriedades bioquímicas e espectro e mecanismo de ação (DEEGAN et al., 2006; GÁLVEZ et al., 2007). Existem diversas propostas para a classificação das bacteriocinas, uma delas leva em consideração sua estrutura primária e as subdivide em: classe I, composta por peptídeos

modificados chamados lantibióticos que contribuem para a estabilidade contra o calor, alterações de pH e melhora na tolerância à oxidação; classe II, com peptídeos não modificados, pequenos e estáveis ao calor, com atividade conhecida contra *Listeria* spp. e, as de classe III, composta por bacteriocinas de maior tamanho e sensíveis ao tratamento térmico (60 a 100 °C por 15 minutos) tendo mecanismo de ação diferente das demais classes pois se baseia na lise da parede celular do microrganismo alvo (DEEGAN et al., 2006).

Por não serem tóxicas para células eucarióticas, as bacteriocinas possuem diferentes espectros de ação e diferem da maioria dos antibióticos terapêuticos por serem agentes protéicos que são rapidamente digeridos pelas proteases no trato digestivo de humanos, tendo, com isso, um papel importante também na redução de incidência de diarreia (COELHO et al., 2014).

A aplicação de bacteriocinas em alimentos como agente bioconservador pode trazer uma série de benefícios, tais como a extensão do tempo de prateleira, proteção extra durante condições de abuso de temperatura, diminuição do risco de transmissão de microrganismos patogênicos na cadeia de alimentos, redução da necessidade de aplicação de conservantes químicos e possibilidade de uso de tratamentos térmicos mais brandos (GÁLVEZ et al., 2007).

A nisina é a única bacteriocina comercial de aplicação em alimentos. As bacteriocinas mais estudadas são a nisina, pediocina e sakacina, produzidas por cepas de *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus sakei*, respectivamente. Podem ser incorporadas aos alimentos de, pelo menos, três formas: usando um preparado de bacteriocinas purificado ou semi purificado como um ingrediente no alimento; incorporando um ingrediente previamente fermentado com uma bactéria produtora de bacteriocinas; ou utilizando a cultura produtora de bacteriocinas diretamente no alimento como uma cultura *starter*. O uso de bacteriocinas purificadas nem sempre é atrativo para a indústria de alimentos, pois nessa forma ela deve ser rotulada como aditivo e requer aprovação legal para o seu uso. As duas últimas alternativas não requerem aprovação legal e, tampouco precisam ser rotuladas e por isso são mais atrativas de incorporação aos alimentos (DEEGAN et al., 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM

As amostras analisadas neste trabalho foram de presuntos cozidos fatiados, adquiridas aleatoriamente, conforme disponibilidade de venda, em quatro diferentes estabelecimentos comerciais tipo supermercados, de médio a grande porte da região Oeste do Estado do Paraná. Previamente foram selecionados, de forma aleatória, três marcas distintas de empresas com importância na comercialização de derivados cárneos no mercado nacional e submetidas ao Serviço de Inspeção Federal (SIF). As amostras foram adquiridas entre maio de 2016 a março de 2017.

Os dados de identificação dos locais onde foram adquiridas as amostras, bem como dos fabricantes dos produtos foram codificados e serão mantidos em sigilo, atendendo aos requisitos éticos. Para os estabelecimentos comerciais foi utilizada a codificação DC, EB, FM, GP. Já para identificar a marca do produto foi utilizada a codificação A, B e C seguida por I ou V para identificar o local de fatiamento, indústria ou varejo, respectivamente.

Foram coletadas, de cada marca, 40 amostras nas embalagens originais de fábrica e 20 amostras fatiadas no estabelecimento comercial, acondicionadas e comercializadas em bandejas de poliestireno cobertas por filme de PVC. Todas as amostras foram analisadas após a sua aquisição (Tempo 1) e ao fim da validade indicada no rótulo (Tempo 2).

As amostras provenientes da indústria foram coletadas em duplicata no intuito de simular o que ocorre no consumidor final, uma vez que as validades dessas amostras variaram de 30 a 60 dias e na prática são consumidas em no máximo uma semana. O cuidado tomado na coleta das amostras foi de manter sempre o mesmo SIF e lote e a armazenagem ocorreu em geladeira com temperatura controlada entre 7 °C e 8 °C. Para as amostras fatiadas no próprio estabelecimento comercial, o presunto cozido foi dividido, de forma asséptica, na embalagem para ser utilizada nas análises no Tempo 1 e Tempo 2 simulando o acondicionamento e armazenamento como no consumidor final. Essas amostras permaneceram acondicionadas na própria embalagem no intervalo entre as análises sendo conservadas em geladeira com temperatura controlada entre 7 °C e 8 °C.

Para a aquisição de todas as amostras, independente da origem de fatiamento, indústria ou estabelecimento comercial, procurou-se a data mais próxima ou o próprio dia de fabricação. O número total de amostras coletadas e sua distribuição são mostrados na TABELA 3.

TABELA 3 – NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS DE PRESUNTO COZIDO POR MARCA NOS ESTABELECIMENTOS COMERCIAIS DA REGIÃO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ

MARCA	Nº AMOSTRAS PRESUNTOS FATIADOS NA INDUSTRIA	Nº AMOSTRAS PRESUNTOS FATIADOS MERCADO VAREJISTA	TOTAL
A	20	20	40
B	20	20	40
C	20	20	40
TOTAL	60	60	120

FONTE: A autora (2017)

No total, foram adquiridas 120 amostras gerando 240 análises sendo 120 análises no Tempo 1 e 120 análises no Tempo 2.

Todas as amostras foram adquiridas em supermercados no Oeste do Estado do Paraná e transportadas em caixas isotérmicas com gelo até o Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água (LACOMA), da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, para a realização das análises propostas.

4.2 AVALIAÇÃO DA AMOSTRA

As primeiras avaliações realizadas antes das análises microbiológicas foram da integridade da embalagem, impressão das datas de fabricação e validade, número do SIF, lote e marca. Em todos os estabelecimentos comerciais aonde foram adquiridas as amostras, as informações na embalagem das amostras fatiadas no próprio estabelecimento continham apenas as informações de marca, informações nutricionais e datas da fabricação e validade não sendo possível identificar a unidade produtora da indústria em questão. Vale ressaltar que as amostras fatiadas no estabelecimento comercial não foram fatiadas na hora, mas estavam disponibilizadas em gôndolas.

4.3 ANÁLISES LABORATORIAIS

Para as análises microbiológicas, foram realizadas análises qualitativas e quantitativas para *Listeria* spp. e, no caso de positividade, realizou-se a pesquisa para *Listeria monocytogenes* com confirmação através de testes bioquímicos como catalase, coloração de GRAM, fermentação de açúcares, hemólise e motilidade.

A quantificação para o gênero *Listeria* se faz necessária para estabelecer uma correlação com os limites máximos permitidos deste microrganismo em alimentos prontos para consumo, definidos em legislações vigentes em outros países.

Para as Bactérias Ácido Láticas (BAL), as análises microbiológicas foram quantitativas.

4.3.1 *Listeria monocytogenes*

Todas as amostras obtidas no Tempo 1 e Tempo 2 foram submetidas a pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes* de acordo com os protocolos descritos nas ISO 11290-1 e 11290-2 (ISO, 1996; ISO, 2004a; ISO, 2004b), respectivamente, assim como a confirmação para *Listeria monocytogenes* através de testes bioquímicos.

4.3.1.1 Quantificação de *Listeria monocytogenes*

Para quantificação de *Listeria monocytogenes*, segundo a ISO 11290-2 (ISO, 2004b), uma porção de 25 g de cada amostra foi pesada, seguido da adição de 225 ml de Caldo Half-Fraser (BD Difco™) sem suplemento como pré-enriquecimento, homogeneizada e incubada a 20 °C por 1 h para recuperação de células injuriadas. Na sequência, em 3 placas de ágar *Listeria* Ottaviani Agosti (ALOA) (Oxoid) semeou-se em superfície volumes de 0,3 mL, 0,3 mL e 0,4 mL, respectivamente, totalizando um volume final de 1 mL. As placas foram incubadas a uma temperatura de 35 a 37 °C por 24 a 48 h.

Após o crescimento no ágar, foram selecionadas pelo menos 5 colônias de cada placa com contagem de até 150 colônias com características fenotípicas de *Listeria monocytogenes*, cepas verde-azuladas rodeadas por halo opaco. Em casos

em que haviam menos de 5 colônias típicas na placa, todas foram selecionadas para confirmação e purificação.

As colônias previamente selecionadas, foram transferidas para ágar Trypticase de Soja com 0,6% de Extrato de Levedura (TSA-YE) (BD Difco™) com plaqueamento na forma de estrias de esgotamento, incubadas a 37 ± 1 °C por 18 a 24 h.

A confirmação se deu por testes bioquímicos já mencionados anteriormente e que serão descritos mais adiante.

Após a confirmação foram efetuados os cálculos para a enumeração do microrganismo, sendo utilizadas as informações do número de colônias confirmadas, número de colônias submetidas à confirmação, número total de colônias características no ágar e quantidade da amostra inoculada por diluição conforme preconizado pela Norma ISO 11290-2 (ISO, 2004b). Os resultados são expressos em unidade formadoras de colônias por grama (UFC/g).

4.3.1.2 Verificação da Presença/Ausência de *Listeria monocytogenes*

Para detecção de *Listeria monocytogenes* foram seguidos os procedimentos da ISO 11290-1 (ISO, 1996; ISO 2004a), que compreendem as etapas de pesagem de 25 g de cada amostra com adição de 225 mL do caldo de enriquecimento primário, Half-Fraser (BD Difco™) com suplemento, homogeneização e incubação a 30 °C por 24 h.

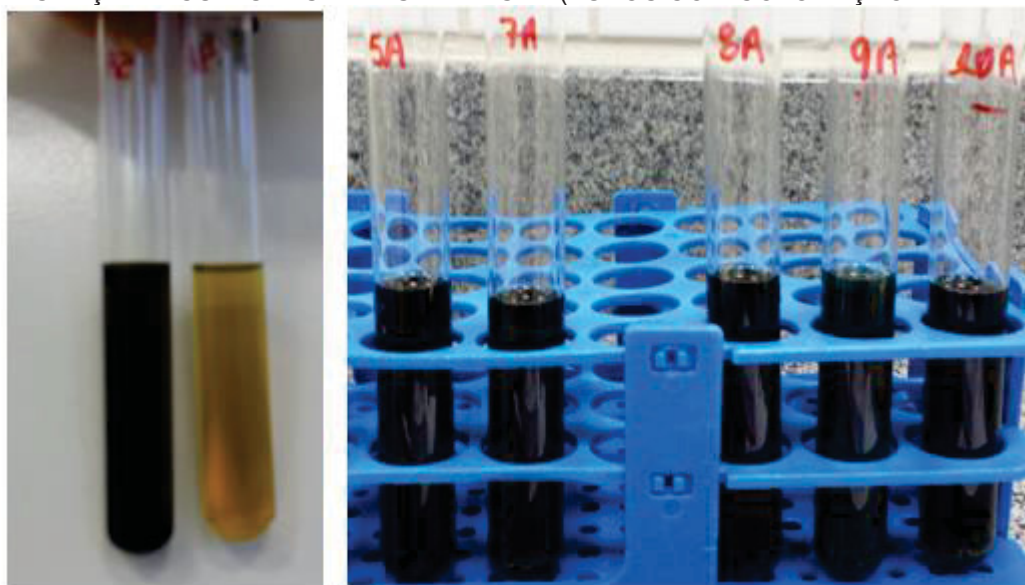
O restante da amostra com o caldo Half-Fraser do enriquecimento primário, o qual não foi totalmente utilizado na técnica de quantificação, foi acrescido com suplemento, incubado a 30 °C por 24 h. A partir do caldo de pré-enriquecimento, após incubação, uma alíquota de 0,1 ml foi transferido para um tubo contendo 10 mL de caldo Fraser (BD Difco™), enriquecimento secundário, acrescido de suplemento. O tubo foi agitado e incubado de 35 a 37 °C por 48 h.

Após o período de incubação, o tubo foi agitado e observado quanto a coloração. A presença de íons de ferro no caldo Fraser detecta a reação de hidrólise da esculina. Todas as espécies de *Listeria* spp. hidrolisam a esculina, e a mudança de cor do caldo de amarelo passa a ficar enegrecido devido a reação de hidrólise da esculina pelas culturas de bactérias responsáveis pela hidrólise formando o 6,7-dihidroxycumarina que reage com os íons de ferro (FRASER; SPERBER, 1988).

Assim, apenas do tubo com caldo enegrecido, conforme FIGURA 1, com o auxílio de uma alça estéril, alíquotas foram transferidas e estriadas na superfície dos ágares *Listeria* Ottaviani Agosti (ALOA) (Oxoid) e Oxford (OXA) (BD Difco™) com o objetivo de isolar e verificar fenotipicamente as colônias. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 a 48 h.

No meio OXA as colônias de *Listeria* spp. são pequenas, pretas e rodeadas por um halo preto (proveniente da hidrólise da esculina) e não se distinguem colônias de *Listeria* patogênica ou não.

FIGURA 1 – TUBOS COM CALDO FRASER DEMONSTRANDO A PRESENÇA DE CULTURAS DE *LISTERIA* SPP. QUE HIDROLISAM A ESCULINA (TUBOS ENEGRECIDOS) E TUBO SEM A PRESENÇA DE CULTURAS DE *LISTERIA* SPP (TUBOS COM COLORAÇÃO AMARELA)

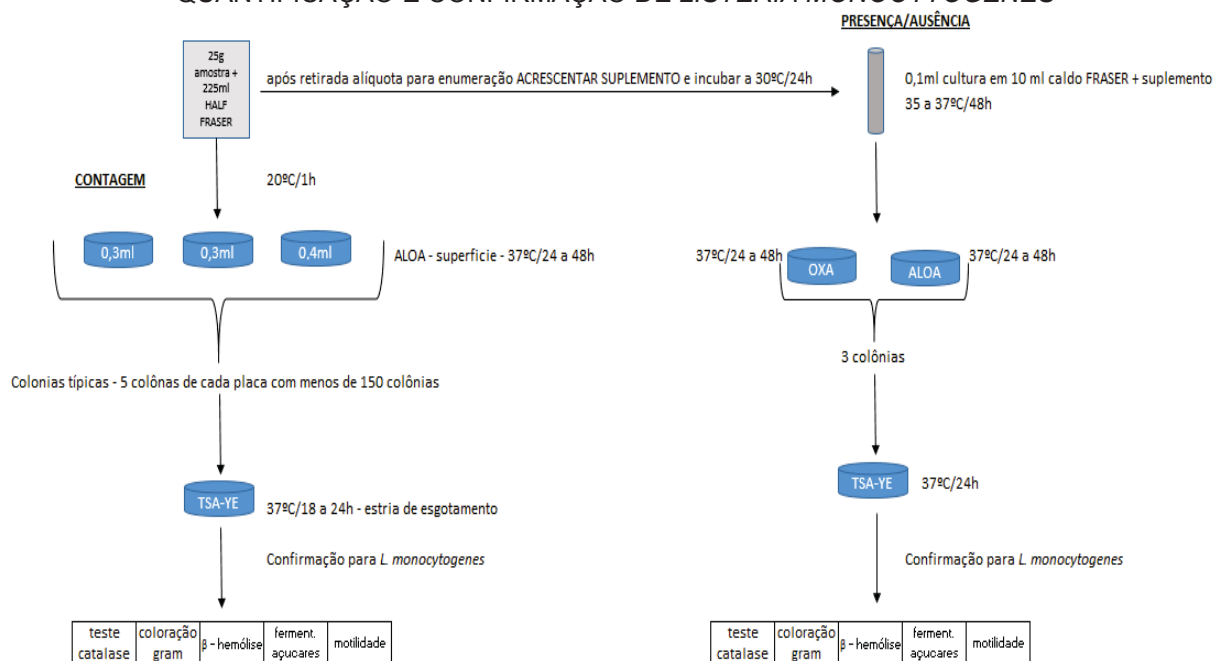


FONTE: A autora (2017)

Após o crescimento nos ágar, foram selecionadas pelo menos 3 colônias de cada placa com características fenotípicas de *Listeria* spp., as quais foram transferidas para ágar Trypticase de Soja com 0,6% de Extrato de Levedura (TSA-YE) (BD Difco™) para purificação com plaqueamento na forma de estrias de esgotamento, incubadas a 37 ± 1 °C por 18 a 24 h. Na sequência, fez-se a confirmação por testes bioquímicos.

A FIGURA 2 representa em forma de esquema ilustrativo o protocolo de quantificação e detecção de *Listeria monocytogenes* utilizado neste trabalho.

FIGURA 2 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROTOCOLO UTILIZADO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*



FONTE: A autora (2017)

4.3.2 Confirmação Bioquímica de Espécies de *Listeria*

Na etapa de purificação das colônias isoladas em ágar Trypticase de Soja com 0,6% de Extrato de Levedura (TSA-YE) (BD Difco™), após incubação e crescimento das colônias, as placas foram observadas sob luz oblíqua (método de Henry) e selecionada apenas uma colônia azulada por placa com característica do gênero *Listeria* para a realização das provas bioquímicas (FIGURA 3).

A colônia selecionada foi transferida para um tubo com ágar Trypticase de Soja com 0,6% de Extrato de Levedura (TSA-YE) (BD Difco™), incubada a 37°C por 24 h para que todos os testes pudessem ser realizados simultaneamente.

FIGURA 3 – PLACA DE TSA-YE COM COLÔNIAS AZULADAS, CARACTERÍSTICA DO GÊNERO *LISTERIA*



FONTE: A autora (2017)

4.3.2.1 Teste produção de catalase

Nas placas de TSA-YE contendo os isolados foram adicionadas gotas de peróxido de hidrogênio a 3 %. Imediatamente nas placas aonde era observado o surgimento de bolhas de oxigênio como consequência da presença da enzima catalase a colônia foi considerada positiva. O não surgimento das bolhas caracteriza um resultado de catalase negativa.

4.3.2.2 Coloração de Gram

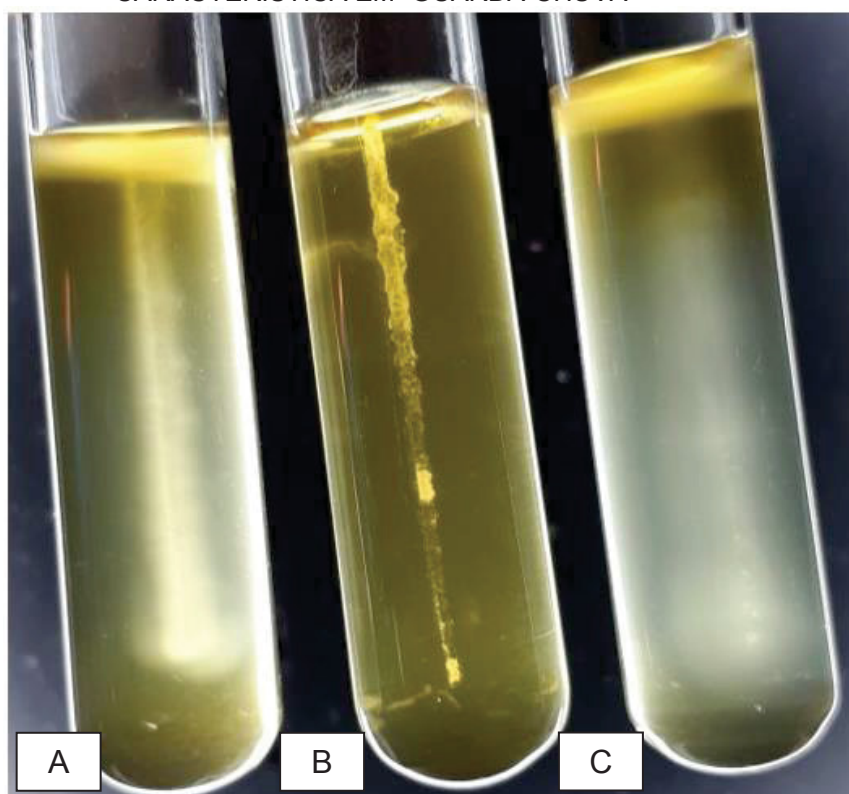
Do tubo de TSA-YE, retirou-se uma colônia para realização da coloração de Gram onde uma colônia foi transferida com o auxílio de uma alça estéril para a lâmina, homogeneizada com água destilada e fixada com o calor. A lâmina foi coberta com solução de violeta de genciana durante um minuto, lavada com água destilada, em seguida a lâmina foi coberta com solução de lugol (mordente), por mais um minuto e novamente lavada com água destilada. A lâmina foi inclinada e gotejado álcool-acetona por cerca de quinze segundos e lavada rapidamente com água corrente. O último passo consistiu em cobrir a lâmina com fucsina de gram e aguardar trinta

segundos. A lâmina foi lavada, seca e observada ao microscópio em objetiva de imersão (100X). Os esfregaços de coloração roxa indicam bactérias Gram positivas (FIGURA 4) enquanto esfregaços de coloração rosa/vermelho indicam bactérias Gram negativas (BARROW; FELTHAM, 1993; SILVA et al., 2010).

4.3.2.3 Teste de motilidade

Para avaliar a motilidade do microrganismo, os isolados foram inoculados, com o auxílio de um arame estéril, em tubos de ensaio contendo 3 mL de ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM) (BD Difco™). Os tubos foram incubados a 25 °C por até 7 dias com observações diárias quanto a presença da motilidade característica em “guarda-chuva” no terço superior do ágar (FIGURA 4).

FIGURA 4 – TESTE DE MOTILIDADE EM MEIO SIM – PRESENÇA DE MOTILIDADE CARACTERÍSTICA EM “GUARDA-CHUVA”



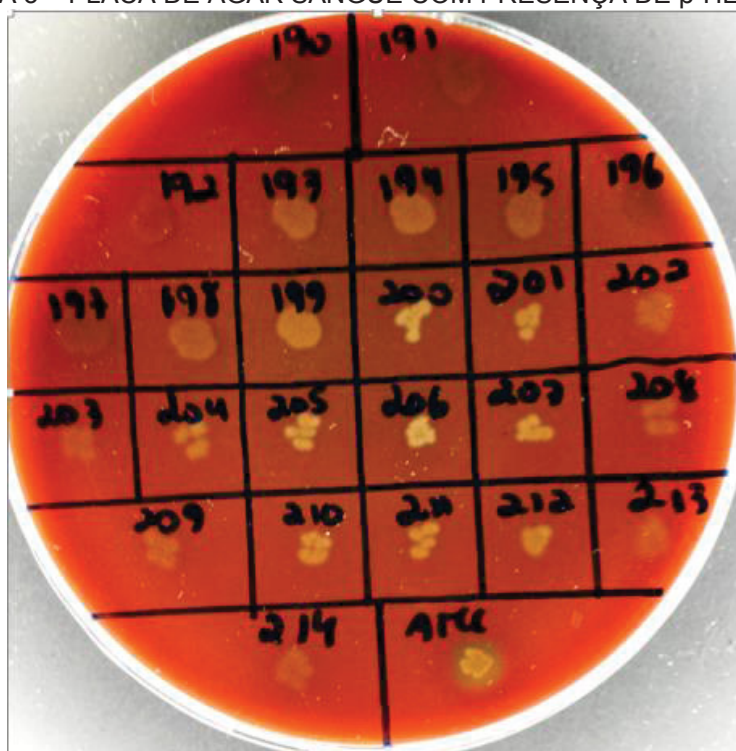
A – Tubo controle (ATCC 7644); B – Cepa imóvel; C – Cepa característica com motilidade em “guarda-chuva”

FONTE: A autora (2017)

4.3.2.4 Teste de hemólise

Para determinar o tipo de hemólise foi usado ágar sangue composto de meio Tripticase de Soja Tripticase de Soja (TSA) (BD Difco™) adicionado de 5 % de sangue desfibrinado de equino. Após a inoculação por picada, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 a 48 h e observadas quanto à presença de zonas de clareamento ao redor do crescimento indicando hemólise pela destruição total dos eritrócitos provocadas pela produção de β -hemolisina (FIGURA 5) (BARROW; FELTHAM, 1993).

FIGURA 5 – PLACA DE ÁGAR SANGUE COM PRESENÇA DE β -HEMÓLISE

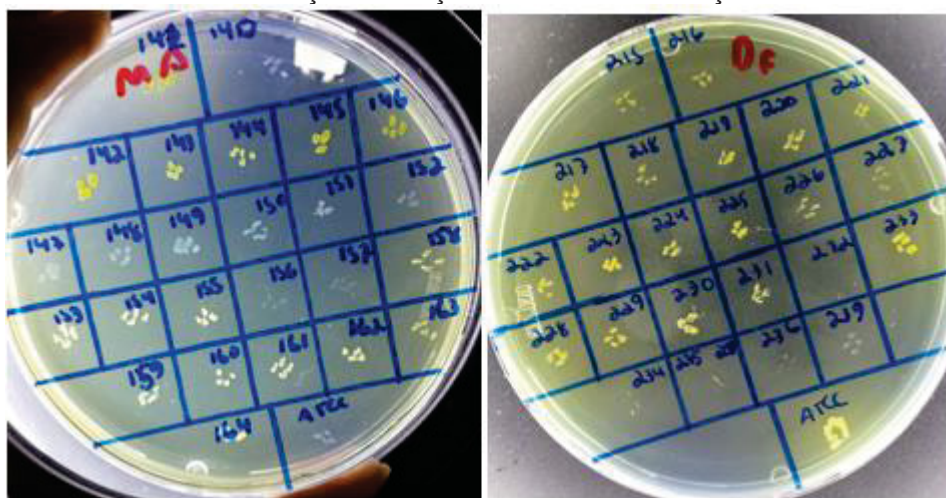


FONTE: A autora (2017)

4.3.2.5 Teste de fermentação de açúcares

Em placas com ágar Púrpura de Bromocresol (BD Difco™), adicionado dos respectivos açúcares (xilose, ramnose, dextrose e manitol) a serem testados, na concentração final de 1%, a colônia foi inoculada por picada (FIGURA 6), as placas incubadas a 37 °C por 24 a 48 h e feito a leitura. O surgimento de halo amarelo ao redor do inóculo indica resultado positivo indicando que o microrganismo é capaz de produzir ácido a partir do carboidrato fornecido.

FIGURA 6 – FEMENTAÇÃO DE AÇUCARES – INOCULAÇÃO POR PICADA



FONTE: A autora (2017)

4.3.3 Bactérias Ácido Láticas (BAL)

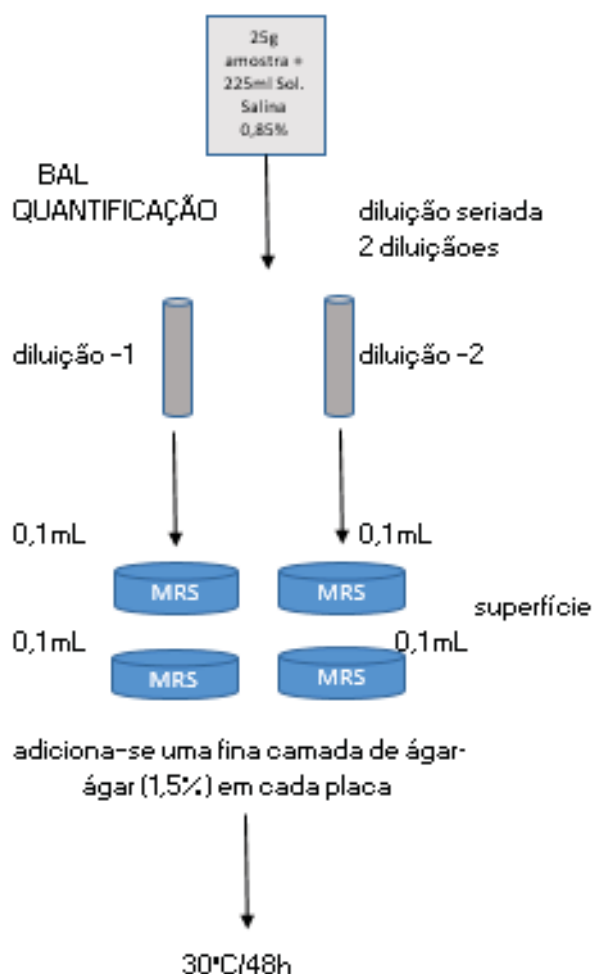
Todas as amostras obtidas no Tempo 1 e Tempo 2 foram submetidas a técnica de contagem de BAL. O método utilizado foi o de sobreposição de ágar com modificações (LEWUS et al., 1991; De MARTINIS et al.; 2001; SILVA et al., 2010).

Para contagem de BAL, uma porção de 25 g de cada amostra foi pesada, seguido de adição de 225 mL de solução salina 0,85% em sacos estéreis e homogeneizada para então prosseguir com as diluições seriadas com tubos de solução salina 0,85%. Duas diluições de cada amostra foram selecionadas e inoculadas em duplicata em placas com ágar Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (Oxoid). Foram inoculados 0,1 mL de cada diluição e rapidamente espalhado o inóculo com alça de Drigalski por toda a superfície do meio até que o excesso de líquido fosse absorvido. Na sequência, foi adicionada uma fina camada de ágar-ágar (Oxoid) a 1,5% suficiente para cobrir toda a placa e simular um ambiente de anaerobiose. Após a placa estar solidificada a mesma foi incubada a 30 °C por 48 h.

Após o período de incubação foram selecionadas para contagem as placas com 25 a 250 colônias sendo o cálculo do resultado feito de acordo com o número de colônias contadas e a diluição inoculada conforme preconizado na Instrução normativa – IN nº 62 (BRASIL, 2003). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por grama.

A FIGURA 7 representa, em forma de esquema ilustrativo, o protocolo de quantificação de BAL utilizado neste trabalho.

FIGURA 7 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROTOCOLO UTILIZADO PARA QUANTIFICAÇÃO DE BAL



FONTE: A autora (2017)

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas no programa XLStat Versão 19.4 Addinsoft (2017), assumindo um nível de significância de 5%. As análises de PERMANOVA foram realizadas no programa PAST Versão 2.17c (Ø. Hammer, D. A. T. Harper, 2013), também assumindo um nível de significância de 5%.

Para realizar a avaliação da classificação geral dos dados bioquímicos de *Listeria* spp., bem como a associação de presença/ausência de *Listeria* spp. dos produtos fatiados na indústria e no varejo, considerando o estabelecimento comercial e seu tempo de prateleira foi aplicado o teste de Qui-quadrado para Independência. Os mesmos testes foram também aplicados para avaliação da associação de presença/ausência de *Listeria* spp. dos produtos das diferentes marcas, considerando

o estabelecimento comercial e seu tempo de prateleira. Para estas mesmas avaliações, porém em situações em que os produtos tiveram a ocorrência de *Listeria* spp. apenas na indústria, ou apenas no varejo, foi aplicado o teste de Qui-quadrado para Aderência. Para ambos os testes, foi realizado ajuste pelo Método de Monte Carlo, quando os pressupostos estatísticos não foram alcançados.

Para a avaliação da relação de contagem de *Listeria* spp. e a contagem de bactérias ácido-láticas, considerando o tempo de prateleira, os dados foram avaliados quanto ao padrão de distribuição por meio do teste de Shapiro-Wilk, e uma vez que não estavam em acordo com o pressuposto de normalidade, foram comparados por meio do teste não-paramétrico de Wilcoxon.

Para avaliar a associação entre a quantidade de bactérias ácido-láticas e a presença e ausência de *Listeria* spp., considerando o tempo de prateleira foi utilizado o teste não paramétrico de Permanova fator-duplo. Este mesmo teste foi também utilizado para se analisar a associação de quantificação de *Listeria* spp. entre os estabelecimentos comerciais do varejo, considerando o tempo de prateleira.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EMBALAGEM, ROTULAGEM E VALIDADE

As 120 amostras adquiridas provenientes da indústria apresentaram conformidade em 100 % das embalagens e nas informações de rotulagem, como impressão de informações de data de fabricação e validade, lote, SIF, número do registro junto ao MAPA, composição do produto, tabela nutricional, informações sobre armazenagem e informação do tempo de consumo após aberto como preconiza a Instrução Normativa nº 22 (BRASIL, 2005) e Resolução RDC nº 360 (BRASIL, 2003c). Independente da marca, todas as embalagens traziam em seu rótulo a informação de consumir após aberto em até 5 dias. Para a informação do tempo de prateleira do produto, que é a data de validade, cada uma das três marcas diferiu entre si como mostra a TABELA 4.

TABELA 4 – TEMPO DE PRATELEIRA DOS PRESUNTOS COZIDOS FATIADOS NA PRÓPRIA INDÚSTRIA POR MARCA

ORIGEM	MARCA	VALIDADE (EM DIAS)
INDÚSTRIA	A	60
	B	45
	C	30

FONTE: A autora (2017)

Todas as indústrias selecionadas para este estudo, estão registradas junto ao MAPA. Assim, para que ocorra a aprovação do registro de rótulo do produto junto ao referido órgão fiscalizador, é preciso atender aos requisitos do RTIQ, quando houver, e, apresentar a formulação, realizar análises microbiológicas e físico químicas que comprovem o tempo de prateleira do produto para que o fiscal agropecuário analise e dê o deferimento ao registro de rótulo para a comercialização, seja em âmbito nacional ou internacional. Assim, a diferença do tempo de prateleira entre as três empresas, dos presuntos fatiados na própria indústria, não torna o produto da marca A mais ou menos seguro que o da marca B ou C, e vice-versa, em virtude da validade comercial, pois todos tiveram uma base técnica embasado em análises microbiológicas e físico químicas para a determinação desse tempo de prateleira

desse produto. A diferença de até 30 dias de validade entre as indústrias se deve, possivelmente, por diferenças de formulação, tecnologias diferentes de embalagem e, carga microbiana presente no ambiente de processamento desse produto. Diante disso, cada indústria apresenta a sua realidade de processamento e é responsável pela validade de seus produtos e em suas embalagens declaram o prazo a ser consumido e a temperatura a ser conservado, o que de certa forma dá credibilidade ao consumidor para consumir produtos fatiados da indústria frente aos fatiados no varejo.

Para as 60 amostras de presunto provenientes de fatiamento no próprio estabelecimento comercial, todas apresentaram embalagens íntegras e rótulos com as informações necessárias preconizadas nas legislações já citadas como, dados de data de fabricação e data de validade legíveis, informações nutricionais e marca.

Nas amostras de presuntos fatiados nos estabelecimentos comerciais, a marca era identificada através de um adesivo fornecido pela própria indústria ao supermercado, porém não havia informações de lote e/ou SIF nas embalagens, não possibilitando a identificação da unidade produtora da peça original. Esse ponto merece atenção por parte das autoridades e dos consumidores, uma vez que as legislações federais não exigem a informação do lote de origem nas embalagens de alimentos fracionados e, a falta desta informação não garante a rastreabilidade do produto nem as tomadas de decisões rápidas de recolhimento em casos de necessidade real de *recall*, causando riscos sérios à saúde pública, perda de credibilidade da indústria envolvida e do supermercado frente aos consumidores e perdas econômicas com o recolhimento de produtos a mais do necessário, ou seja, em uma situação real de *recall* todo o estoque da produção deve ser recolhido.

O fatiamento não ocorreu na presença do consumidor, estando os presuntos fatiados disponibilizados em gôndolas refrigeradas. A validade desses presuntos indicadas nos rótulos apresentaram variações de 4 a 9 dias. Houve variação de tempo de prateleira do produto fatiado no mesmo estabelecimento comercial em produtos da mesma marca de até 4 dias (TABELA 5).

TABELA 5 – TEMPO DE PRATELEIRA DOS PRESUNTOS FATIADOS NOS ESTABELECIMENTOS COMERCIAIS POR MARCA

COMERCIO VAREJISTA	MARCA	Nº AMOSTRAS COMPRADAS	VALIDADE (DIAS)		Nº AMOSTRAS	
			MIN	MAX	MIN	MAX
DC	A	12	--	5	--	12
	B	6	--	5	--	6
	C	11	--	5	--	11
TOTAL DC		29			--	29
FM	A	1	--	4	--	1
	B	6	5	6	1	5
	C	1	--	6	--	1
TOTAL FM		8			1	7
GP	A	7	7	9	2	5
	B	8	5	9	1	7
	C	8	5	6	7	1
TOTAL GP		23			4	4
TOTAL GERAL		60				15

FONTE: A autora (2017)

No supermercado EB, não foi adquirida nenhuma amostra de produto fatiado no próprio estabelecimento, apenas produtos provenientes da indústria. No supermercado DC, foram adquiridas 48,33 % das amostras do varejo e, nesse estabelecimento, nota-se coerência no tempo de prateleira dos produtos fatiados mantendo sempre 5 dias de validade, independente da marca, cumprindo com o que está estabelecido na Resolução RDC nº 216 (BRASIL, 2004), onde o prazo máximo de consumo do alimento preparado e conservado sob refrigeração a temperatura de 4°C, ou inferior, deve ser de 5 dias. Isso não ocorreu nos estabelecimentos FM e GP, onde 13,33 % e 38,33 %, das amostras de varejo foram adquiridas, respectivamente. O supermercado FM, declarou no rótulo de seus produtos fatiados da marca A, validade de 4 dias em 1 amostra (1,67 %); na marca B, validade de 5 dias em 1 amostra (1,67 %) e de 6 dias em 5 amostras (8,33 %). No supermercado GP, a discrepância foi ainda maior; produtos que no rótulo mostravam ser da mesma marca, fatiados no mesmo estabelecimento tiveram até 3 tempos diferentes estabelecidos para o tempo de prateleira dos produtos. Essa discrepância ocorreu com as três marcas (A, B e C). Na marca A, foi declarado no rótulo validade de 7 dias em 2 amostras (3,33 %) e, 9 dias em 5 amostras (8,33 %). Na marca B, foi declarado no rótulo validade de 5 dias em 1 amostras (1,67 %) e, 9 dias em 7 amostras (11,67 %). Já para a marca C, foi declarado no rótulo validade de 5 dias em 1 amostra (1,67 %),

6 dias em 4 amostras (6,67 %) e 7 dias em 3 amostras (5 %). Assim, das 60 amostras do varejo, 27 amostras (45 %) apresentaram validade superior a 5 dias, dessas 21 amostras (35 %) foram adquiridas no mesmo estabelecimento comercial (GP).

Esses dados mostram uma realidade preocupante, uma vez que cada estabelecimento fracionador é quem determina, sem critérios científicos, o tempo de prateleira dos produtos fatiados que ofertam aos seus consumidores. Apesar de existir diversos fatores que influenciam a qualidade sensorial e a segurança de um produto cárneo fatiado, não foram encontrados trabalhos científicos e nem legislação em âmbito federal e estadual que especifiquem o tempo de prateleira de produtos cárneos após o fatiamento no varejo. Conforme foi constatado através desse trabalho, este prazo varia entre estabelecimentos e, entre as próprias marcas, colocando em dúvida a segurança desse tipo de produto e a ética dos estabelecimentos comerciais que, com o sistema de autosserviço, onde os produtos não são fracionados na frente do consumidor, mas sim expostos já embalados em gôndolas, facilitou o consumo pela agilidade e alavancou as vendas deixando o consumidor cada vez mais exposto a sérios riscos de ocorrência de DTA. Não há garantia ao consumidor que esses alimentos estejam seguros ao consumo até o final da validade comercial declarada no rótulo pelo comércio varejista. Aliado ao fato de não haver rastreabilidade nesse tipo de alimento fracionado temos uma questão séria de saúde coletiva que merece ser discutida em âmbito nacional. Siqueira et al. (2017), recomendam que parâmetros microbiológicos devem ser estabelecidos pelos órgãos reguladores de saúde para alimentos cárneos e seus embutidos, com o intuito de oferecer um alimento seguro para os consumidores, uma vez que observaram que *Listeria* spp. está amplamente distribuída em áreas de manipulação dos estabelecimentos varejistas favorecendo a contaminação dos alimentos e, conseqüentemente, oferecendo riscos à saúde pública.

Cesar et al. (2011), em 106 amostras, entre matéria prima carne, produto acabado e *pools* de *swabs* do ambiente pós cozimento, apresentaram valores médios que indicaram que 7 a 9 % das salsichas continham *L. monocytogenes*. Dos 88 isolados de *L. monocytogenes*, identificou-se que 95 % eram dos sorotipos 4b, 1/2a e 1/2b. Esses autores concluíram que é preocupante a escassez de dados epidemiológicos, ausência de padrões e falta de informação ao consumidor quanto aos riscos ao consumir produtos RTE.

5.2 LISTERIA SPP.

5.2.1 Amostras fatiadas e embaladas na indústria

Nas 60 amostras de presunto cozido fatiado, proveniente da indústria, não foi confirmada nenhuma positividade para *L. monocytogenes* e nem para *Listeria* spp., independente do dia de análise. No entanto, esse dado conflita com os achados de Bersot et al. (2008), que observou que 100 % das amostras analisadas de mortadela fatiada embalada a vácuo foram positivas para *L. monocytogenes*. Vitas; Garcia-Jalon (2004), em estudo realizado na Espanha encontrou 8,8 % de *L. monocytogenes* em produtos cárneos prontos para consumo e, 6,7 % em produtos curados.

5.2.2 Amostras fatiadas e embaladas no varejo

L. monocytogenes não foi detectada em nenhuma das 60 amostras analisadas provenientes do fatiamento no varejo, independentemente do dia de análise (T1 ou T2).

Contudo, das 60 amostras provenientes do varejo, em 14 (23,3 %) houve presença de *Listeria* spp., independente do dia de análise. Dessas, 10 amostras (16,7 %) já se encontravam contaminadas no início da validade (T1) e, 7 delas (11,7 %) mantiveram o mesmo comportamento até o dia de vencimento (T2). Das 7 amostras restantes, 4 amostras (6,7 %), *Listeria* spp. foi detectada apenas no vencimento da amostra (T2) e, em 3 amostras (5,0 %), *Listeria* spp. foi detectada apenas no início da validade (T1). Na metodologia de quantificação de *Listeria* spp., observamos positividade em 7 amostras (11,7 %), conforme TABELA 6.

Na comparação entre os percentuais de positividade pelo teste de Várias Proporções a 5% de probabilidade, observa-se que não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre as ocorrências de presença/ausência entre T1 (dia de obtenção da amostra) e T2 (dia do vencimento); porém houve diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre as ocorrências de quantificação de *Listeria* spp. em T1 e T2 (TABELA 6).

TABELA 6 – DISTRIBUIÇÃO DAS POSITIVIDADES PARA *LISTERIA* SPP. ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS DE PRESUNTOS COZIDOS FATIADOS PELO COMERCIO VAREJISTA, CONTAGEM DE *LISTERIA* SPP. E BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

MARCA	Nº Amostra	T1			T2			Validade (dias)/Estab. b.
		P/A	Cont. <i>Listeria</i> spp. (UFC/g)	Cont. BAL (UFC/g)	P/A	Cont. <i>Listeria</i> spp. (UFC/g)	Cont. BAL (UFC/g)	
A	22	A	--	1,7x10 ⁵	P	--	1,1x10 ⁷	7-GP
	38	A	--	3,6x10 ²	P	6,7x10 ²	3,1x10 ⁴	5-DC
	56	P	--	1,9x10 ⁴	P	--	1,4x10 ⁷	7-GP
	58	P	--	2,9x10 ⁵	P	6,4x10 ²	1,1x10 ⁸	9-GP
	60	P	--	2,5x10 ⁵	P	3,1x10 ²	9,9x10 ⁷	9-GP
B	26	P	--	6,0x10 ²	P	3,0x10 ¹	9,3x10 ⁶	9-GP
	34	A	--	9,6x10 ³	P	1,8x10 ²	1,7x10 ⁵	5-FM
	51	P	--	2,8x10 ⁵	P	--	3,5x10 ⁷	9-GP
	54	P	--	2,3x10 ⁵	A	--	1,1x10 ⁸	9-GP
	55	P	--	2,2x10 ⁶	A	--	3,9x10 ⁷	9-GP
C	23	P	3,9x10 ²	2,0x10 ⁵	P	2,5x10 ²	6,3x10 ⁶	7-GP
	25	P	1,0x10 ¹	3,0x10 ³	P	2,0x10 ¹	8,0x10 ⁶	7-GP
	83	P	--	1,1x10 ⁵	A	--	1,2x10 ⁷	6-GP
	84	A	--	5,6x10 ⁴	P	--	4,5x10 ⁶	6-GP
Total	14	10 (P)			4 (P*)			

T1 – dia de obtenção amostra; T2 – dia vencimento amostra; P – Presença; A – Ausência; LS – *Listeria seeligeri*; LIV – *Listeria ivanovii*; LIN – *Listeria innocua*; LW – *Listeria weishimeri*; P* - presença apenas em T2; Cont. – contagem; Estab. – estabelecimento comercial.

FONTE: A autora (2017)

Para as amostras do varejo que apresentaram positividade para *Listeria* spp., houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para contagem de BAL no dia da obtenção e dia de vencimento da amostra inferindo no rápido crescimento desse microrganismos nas amostras. Pela tabela 6, observa-se que apenas as amostras números 34 e 38 apresentaram a validade de 5 dias como preconizado pela Resolução RDC nº 216 (BRASIL, 2004) e, nas análises do dia de vencimento dessas

amostras houve a presença de *Listeria* spp. com contagens de 180 UFC/g e 670 UFC/g, respectivamente. Nas demais amostras com presença de *Listeria* spp., independente da marca, a validade foi acima de 5 dias, variando de 6 a 9 dias.

Luber et al. (2011), cita que em um estudo de risco realizado nos Estados Unidos os produtos cárneos fatiados nos estabelecimentos de venda, são o alimento com maior risco de contaminação por *Listeria* spp. confirmando os achados nesse presente estudo. Da mesma forma, Gombas et al. (2003), observou a presença de *L. monocytogenes* em produtos cárneos fatiados; a prevalência desse microrganismo era maior em produtos cárneos fatiados nos supermercados do que os fatiados na indústria. Porém, a concentração de *L. monocytogenes* foi maior nos produtos cárneos fatiados e embalados pela indústria, esse resultado foi explicado pelo fato de os produtos cárneos fatiados pela indústria terem maior tempo de prateleira, permitindo que o patógeno quando presente, atingisse populações mais elevadas que as encontradas nos produtos fatiados com menor tempo de prateleira.

Nos estudos de relatos de surtos de listeriose ocorridos entre 2005 e 2008, atribuídos a produtos cárneos, Todd e Notermans (2011), relatam que 83 % desses surtos estavam associados a produtos cárneos fatiados no ponto de venda e, 17 % a produtos cárneos fatiados na indústria.

Em um estudo com *blanquet* inteiro e fatiado e, presunto inteiro e fatiado, Araújo et al. (2002), verificaram uma alta incidência de bactérias do gênero *Listeria*, sendo 80% em *blanquet* fatiado e 90 % em presunto fatiado, contrastando com a ausência nas peças inteiras. A ausência de *Listeria* spp. nos produtos inteiros e sua alta ocorrência nos fatiados sugerem provável manipulação inadequada dos produtos no momento do fatiamento.

Apesar de, no presente estudo, não ter detectado *L. monocytogenes*, o achado de 23,3 % de presença de outras espécies do gênero *Listeria* deixa claro que existe uma contaminação nos ambientes de supermercados, seja pela má higienização do ambiente, das instalações e utensílios, seja pela falta de treinamentos e ou falta de conhecimento dos manipuladores quanto aos riscos de contaminações cruzadas e DTA e, da própria existência do risco de listeriose. Já, a baixa ocorrência de *Listeria* spp. nos presuntos da indústria comprova a efetividade do processamento térmico ao qual o produto foi submetido e a evolução na preocupação das indústrias com o risco de contaminações cruzadas pós-processamento. Conforme Vitas; Garcia-Jalon (2004), a *Listeria* spp. é sensível aos tempos e temperaturas praticados para

cocção e a pasteurização dos alimentos e pode haver contaminação pós processamento, porém para minimizar este risco a adoção de rigorosas práticas de higiene e controle, tais como Boas Práticas de Manufatura, Procedimento Padrão de Higienização Operacional com pesquisa de *Listeria* spp. no ambiente e produto final e, a implantação da APPCC se fazem necessárias.

5.2.3 Frequências de *Listeria* spp.

Inicialmente foram isoladas 766 cepas, dessas apenas 229 (30 %) apresentaram motilidade, catalase e gram positivo, variando apenas na fermentação dos açúcares. Todas as cepas isoladas e caracterizadas como *Listeria* spp., utilizando-se para isso, métodos fenotípicos como teste de catalase, coloração de gram, motilidade, β -hemólise e fermentação de açúcares (xilose, ramnose, dextrose e manitol), são originadas de amostras fatiadas no próprio estabelecimento comercial. As frequências de *Listeria* spp. encontradas são mostradas na TABELA 7.

TABELA 7 – FREQUENCIAS DAS ESPECIES DE *LISTERIA* ENCONTRADAS NAS CEPAS DE PRESUNTO COZIDO FATIADO INDEPENDENTE DA ORIGEM E TEMPO DE ANÁLISE

ESPÉCIE	Nº AMOSTRAS COM <i>LISTERIA</i> SPP./ AMOSTRAS CONFIRMADAS (N=229)	% DE AMOSTRAS COM <i>LISTERIA</i> POR ESPÉCIE
<i>L. ivanovii</i>	86	37,5
<i>L. seeligeri</i>	86	37,5
<i>L. innocua</i>	54	23,6
<i>L. welshimeri</i>	3	1,3
Total	229	100

FONTE: A autora (2017)

De todas as cepas isoladas e caracterizadas por testes bioquímicos, *L. ivanovii* (37,5 %) e *L. seeligeri* (37,5 %) foram as que apresentaram as maiores frequências seguida por *L. innocua* (23,6 %) e *L. welshimeri* (1,3%). Andrade et al. (2014), verificando a ocorrência das espécies de *Listeria* em amostras de salsichas tipo *hot dog* e carne moída, comercializadas a granel no Distrito Federal, isolaram 26 cepas de *Listeria* spp. das amostras de salsichas, sendo identificadas 18 cepas (69,2

%) de *Listeria innocua* e 8 cepas (30,8 %) de *L. monocytogenes*. Das 16 cepas originadas da carne moída, 12 (75 %) eram *L. innocua* e 4 (25 %) *L. monocytogenes*.

Segundo Barre et al. (2016), *L. innocua* e *L. monocytogenes* são as espécies mais frequentemente isoladas, porém apenas *L. monocytogenes* é patogênica ao homem e de importância em alimentos, causando listeriose, sendo responsável por surtos veiculados por alimentos com alta mortalidade. As demais espécies, apesar de existem estudos que relatam a infecção de humanos ocasionadas por *L. seeligeri* (GILOT; CONTENT, 2002), *L. ivanovii* (GILOT; CONTENT, 2002;), *L. grayi* (TODESCHINI et al., 1998) e *L. innocua* (KARLI et al., 2014), não possuem importância em alimentos.

Para Kells e Gilmour (2004), o isolamento de qualquer espécie do gênero deve ser considerado, pois acredita-se que *L. monocytogenes* habite os mesmos nichos, embora não seja consenso (TOMPKIN, 2002), a presença de *Listeria* spp. pode servir de indicador para a possível presença de *L. monocytogenes* (D'AMICO; DONNELLY, 2009).

Na caracterização geral de *Listeria* spp. presente em cada marca (A, B, C), considerando sua origem (indústria e varejo), bem como seu tempo de prateleira (T1 – na obtenção; T2 – no vencimento), observou-se presença de *Listeria* spp., porém sem diferença estatística significativa entre os períodos ($p > 0,05$) (TABELA 8).

TABELA 8 – CARACTERIZAÇÃO GERAL DAS FREQUÊNCIAS DE *LISTERIA* SPP. CONSIDERANDO MARCA, ORIGEM E TEMPO DE PRATELEIRA

ORIGEM	MARCA	T1	T2	P-VALOR
INDUSTRIA	A	0	0	--
	B	0	0	
	C	0	0	
VAREJO	A	3	5	0,698
	B	4	3	
	C	3	3	

P-valor obtido pelo teste de Qui Quadrado de Independência com ajuste pelo método Monte Carlo
 FONTE: A autora (2017)

Quando correlacionamos cada espécie de *Listeria* spp., de acordo com a sua origem e tempo de prateleira, para todas as espécies em estudo, não houve diferenças estatísticas significativas entre os dois períodos de avaliação ($p > 0,05$).

Todos os resultados das caracterizações fenotípicas de todas as amostras estão no APÊNDICE 1.

5.2.4 Associação de presença e ausência de *Listeria* spp. com a origem, bem como estabelecimento comercial e tempo de prateleira

Para presença e ausência de *Listeria* spp. para produtos com origem no varejo, houve diferença significativa entre os supermercados tanto no dia de obtenção ($\chi^2=30,106$; $p < 0,0001$) quanto no dia de vencimento ($\chi^2=17,033$; $p < 0,00001$), havendo frequências significativamente elevadas de *Listeria* spp. entre os produtos do estabelecimento comercial GP.

O estabelecimento GP foi o que apresentou a maior incoerência nas datas de validade dos produtos do varejo, apresentando 21 amostras com validade superior a 5 dias; foi, também, o estabelecimento que apresentou a maior positividade para *Listeria* spp., onde das 14 amostras positivas, 12 amostras, 85, 7 %, foram adquiridas nesse estabelecimento. Portanto, infere-se que haja contaminação cruzada durante o fatiamento, seja por deficiência de higienização do ambiente, utensílios, equipamentos e/ou mãos dos colaboradores.

5.2.5 Associação de presença e ausência de *Listeria* spp. e marca do produto, bem como estabelecimento comercial e tempo de prateleira

Para os produtos da marca A, com origem no varejo, houve diferença estatística significativa entre os supermercados no dia de obtenção ($\chi^2=6,555$; $p=0,069$), assim como no dia de vencimento ($\chi^2=9,286$; $p=0,014$), havendo significativamente maior frequência de presença de *Listeria* spp. no estabelecimento GP.

Siqueira et al. (2017), em estudo realizado em Pernambuco, observou que dos 10 estabelecimentos varejistas estudados, 80 % tiveram ao menos uma amostra de ambiente positiva para *Listeria* spp., mostrando que as condições higiênico-

sanitárias dos pontos de coleta não estavam adequadas favorecendo a contaminação dos alimentos ali fatiados e ou manipulados apresentando um risco a saúde pública; além de propiciar um ambiente para formação de biofilme (NGUYEN; BURROWS, 2014).

Para os produtos da marca B com origem no varejo, houve diferença estatística significativa entre os supermercados no dia de obtenção ($\chi^2=7,500$; $p=0,019$), com frequência de *Listeria* spp. significativamente mais elevada no estabelecimento GP. Não houve diferença significativa no dia de vencimento ($\chi^2=3,333$; $p=0,156$).

Para os produtos da marca C, com origem no varejo, não houve diferença estatística significativa entre os supermercados tanto no dia de obtenção ($\chi^2=5,294$; $p=0,198$), quanto no dia de vencimento ($\chi^2=5,294$; $p=0,198$), uma vez que todas as amostras dessa marca, que apresentaram positividade, foram adquiridas no estabelecimento GP.

5.2.6 Relação de contagem de *Listeria* spp. considerando o tempo de prateleira

Foi possível observar que não houve diferença estatística significativa da contagem de *Listeria* spp. em relação ao tempo de prateleira dos produtos fatiados ($V=3$; $p=0,063$).

No dia de obtenção, as contagens variaram de $1,0 \times 10^1$ UFC/g (amostra número 25) até $3,9 \times 10^2$ UFC/g (amostra número 23). No vencimento, as contagens variaram de $2,0 \times 10^1$ UFC/g (amostra número 25) até $6,7 \times 10^2$ UFC/g (amostra número 38). As contagens encontradas para *Listeria* spp. foram relativamente baixas, porém em algumas amostras foi encontrado de 390 UFC/g a 670 UFC/g. Levando em consideração que o patógeno *L. monocytogenes* não foi isolado nessas amostras, apenas *Listeria* spp., conclui-se que as amostras não apresentam risco de contaminação e DTA. Caso *L. monocytogenes* tivesse sido isolada haveria possibilidade de infecção humana já que contagens inferiores a 10^2 UFC/g em alimentos apesar de não serem infectantes, não excluem essa possibilidade. Pelo *Food and Drug Administration*, (2003), assume-se que menos do que mil células possam causar a doença em populações susceptíveis como grávidas, neonatos, crianças, idosos e pessoas imunodeprimidas.

5.2.7 Relação da contagem de bactérias ácido lácticas considerando o tempo de prateleira

Foi possível observar que houve diferença estatística significativa da contagem de bactérias ácido-láticas em relação ao tempo de prateleira dos produtos fatiados ($V=10$; $p<0,0001$) (TABELA 9).

TABELA 9 – QUANTIFICAÇÃO DE BAL CONFORME ORIGEM E TEMPO DE PRATELEIRA

VARIAVEL	INDUSTRIA T1 (UFC/g)	INDUSTRIA T2 (UFC/g)	VAREJO T1 (UFC/g)	VAREJO T2 (UFC/g)
MÍNIMO	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$
MÁXIMO	$4,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^8$
MÉDIA	$4,7 \times 10^4$	$1,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^5$	$1,4 \times 10^7$
DESVIO PADRÃO	$1,1 \times 10^5$	$2,5 \times 10^7$	$3,0 \times 10^5$	$2,8 \times 10^7$
P=VALOR	P=0,001		P<0,0001	

T1 – Obtenção; T2 – Validade
FONTE: A autora (2017)

No dia de obtenção, as contagens para BAL variaram de $1,0 \times 10^1$ UFC/g até $2,2 \times 10^6$ UFC/g. No vencimento, as contagens variaram de $1,0 \times 10^1$ UFC/g até $1,1 \times 10^8$ UFC/g evidenciando o rápido crescimento de bactérias ácido lácticas durante o tempo de prateleira dos produtos.

Foi possível observar que não há diferença estatística significativa das amostras fatiadas na indústria quando associado com as amostras fatiadas no varejo, no tempo de obtenção ($p=0,154$). Também não foi observado diferença estatística significativa das amostras fatiadas na indústria quando associado com as amostras fatiadas no varejo, no tempo de vencimento ($p=0,581$).

Após o processo de cozimento do presunto a flora natural do produto são as BAL, porém em uma quantia muita baixa que não protege os produtos contra o crescimento de patógenos. As BAL naturalmente dominam a microflora de vários alimentos, incluindo carnes crus e produtos à base de carne que são armazenados em embalagens de vácuo ou em atmosfera modificada aumentando a segurança do alimento (MATARAGAS et al., 2003). As embalagens do varejo são bandejas de

poliestireno envoltas em PVC, o que ajuda a rápida deterioração do produto. Em média para as amostras originadas do fatiamento na indústria houve o crescimento de 3 logs e nas amostras fatiadas no varejo, crescimento de 2 logs; essa diferença se explica pelo maior tempo de prateleira das amostras onde o fatiamento é na indústria.

5.2.8 Associação entre a quantidade de BAL e a presença e ausência de *Listeria* spp., considerando o tempo de prateleira

Quando realizada a associação entre a quantidade de bactérias ácido lácticas e a presença e ausência de *Listeria* spp., considerando seu tempo de prateleira, foi possível verificar que houve diferença estatística significativa em relação ao fator presença e ausência de *Listeria* spp. ($F=2,2762$; $p=0,0019$), e em relação ao fator tempo de prateleira do produto ($F=11,318$; $p=0,0001$). Porém, não houve diferença estatística significativa quando analisada a interação desses fatores ($F=-98,346$; $p=0,6429$). Pode-se então interpretar que tanto no momento de obtenção quanto no momento de vencimento, há um maior número de bactérias ácido lácticas quando há presença de *Listeria* spp..

Quando realizada a associação entre a quantidade de bactérias ácido lácticas e a quantificação de *Listeria* spp. considerando seu tempo de prateleira, foi possível verificar que houve diferença estatística significativa em relação ao fator quantificação de *Listeria* spp. ($F=0,11632$; $p=0,0011$), e em relação ao fator tempo de prateleira ($F=1,923$; $p=0,0001$). Porém, não houve diferença estatística significativa quando analisada a interação desses fatores ($F=-21,919$; $p=1$), reforçando que há um maior número de bactérias ácido lácticas quando há presença de *Listeria* spp..

5.2.9 Associação de quantificação de *Listeria* spp. entre os estabelecimentos comerciais do varejo, considerando o tempo de prateleira

Quando realizada a associação entre a quantificação de *Listeria* spp. entre os estabelecimentos comerciais do varejo, considerando o tempo de prateleira, foi possível verificar que não houve diferença estatística significativa em relação ao fator tempo de prateleira ($F=1,8821$; $p=0,1214$), nem em relação ao fator estabelecimento ($F=1,4216$; $p=0,153$), bem como interação desses fatores ($F=0,15585$; $p=0,3972$).

Das 14 amostras que apresentaram positividade para *Listeria* spp., 12 amostras (85,7 %) foram adquiridas no estabelecimento GP, 1 amostra (7,0 %) no estabelecimento DC e, 1 amostra (7,0 %) no estabelecimento FM. Dessas 14 amostras, 5 amostras (35,7 %) apresentaram contagens para *Listeria* spp, onde, em apenas 2 amostras, foi possível quantificar espécies de *Listeria* no dia de obtenção e vencimento (amostras números 23 e 25, marca C).

As amostras adquiridas nos estabelecimentos DC e FM foram as únicas amostras com prazo de validade de 5 dias que apresentaram contagem de *Listeria* spp. em T2 variando de $1,8 \times 10^2$ UFC/g (amostra número 34, marca B) a $6,7 \times 10^2$ UFC/g (amostra número 38, marca A). As demais amostras, com positividade, que apresentaram contagem para *Listeria* spp. foram provenientes do estabelecimento GP, com validade variando de 7 a 9 dias com contagens entre $1,0 \times 10^1$ UFC/g (amostra número 25, marca C, T1, 7 dias de validade) a $6,4 \times 10^2$ UFC/g (amostra número 58, marca A, T2, 9 dias de validade).

6 CONCLUSÕES

No presente estudo não foi detectado e nem isolado *L. monocytogenes*, patógeno de importância em alimentos, em nenhuma amostra independente da marca, origem de fatiamento e tempo da análise.

Da mesma forma, nas amostras com origem de fatiamento na indústria não se detectou nenhuma espécie de *Listeria*. Pressupõe-se que, uma vez que, as marcas adquiridas nesse presente estudo foram originadas de indústrias com fiscalização do MAPA, as mesmas tenham implantadas controles de processo e programas de autocontrole como Boas Práticas de Fabricação, APPCC e Programas de Higienização Operacional e Pré-operacional com controle microbiológico ambiental, de superfície e de produto acabado acarretando em um produto de melhor qualidade higiênico-sanitário com um processo térmico efetivo sem contaminação cruzada pós processamento.

Nas amostras com origem de fatiamento no comércio varejista detectou-se a presença de espécies de *Listeria* em 14 amostras (23,3 %) sendo *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua* e *L. welshimeri*. Nenhuma das espécies isoladas tem importância em alimentos mas sugere uma possível contaminação do ambiente de processamento, utensílios, equipamentos e/ou mãos dos manipuladores. Infere-se, portanto, que há contaminação cruzada durante o fatiamento no comércio varejista e isso se deve, muito provavelmente, pela falta de programas de Boas Práticas de Fabricação, APPCC, procedimentos descritos de higienização e uma fiscalização escassa. Dos 4 estabelecimentos estudados, nenhum possuía Serviço de Inspeção municipal, estadual ou federal, apenas fiscalização do Ministério da Saúde e vigilância sanitária. A falta de uma fiscalização efetiva nesses estabelecimentos, mostra uma realidade preocupante, uma vez que cada estabelecimento fracionador é quem determina, sem critérios científicos, o tempo de prateleira dos produtos fatiados que ofertam aos seus consumidores.

A presença de contagens acima de 100 UFC/g de *Listeria* spp., em amostras provenientes de fatiamento no comércio varejista, representa um risco de saúde pública, mesmo que pequeno por não se tratar de *L. monocytogenes*, e serve como alerta a população, uma vez que a presença de *Listeria* spp. no produto final pronto

para consumo (RTE) serve de indicador para a possível presença de *L. monocytogenes*.

No estabelecimento EB não foi detectado *Listeria* spp. pois as amostras adquiridas eram provenientes de fatiamento na indústria. O supermercado GP foi o que mais apresentou variação no tempo de prateleira. Não mostrando um padrão na validade de seus produtos fatiados, nem mesmo naqueles da mesma marca evidenciando assim a falta de fiscalização e embasamento técnico para validade dos produtos ali fatiados.

Quanto ao atendimento das legislações vigentes para embalagem e rotulagem, as amostras fatiadas na indústria como as fatiadas no comércio varejista apresentaram conformidade.

Para BAL, observou-se que tanto no momento de obtenção quanto no momento de vencimento, há um maior número de bactérias ácido lácticas quando há presença de *Listeria* spp.. Em média para as amostras originadas do fatiamento na indústria houve o crescimento de 3 logs e nas amostras fatiadas no varejo, crescimento de 2 logs; essa diferença se explica pelo maior tempo de prateleira das amostras onde o fatiamento é na indústria.

Diante de todo o exposto, neste trabalho não isolamos o patógeno de importância em alimento, *Listeria monocytogenes*, porém observamos outras espécies de *Listeria* spp. o que pode indicar a presença do patógeno nesses nichos. Assim, sugere-se a continuação deste trabalho com pesquisa de mapeamento genético das espécies encontradas, assim como uma investigação de *Listeria* spp. nos fatiadores do estabelecimento GP e o estudo de tempo de prateleira para produtos fatiados no comércio varejista a fim de estipular um padrão adequada a cada tipo de alimento RTE fatiado. Assim como, a pesquisa de bacteriocinas que sejam antagonistas à *Listeria monocytogenes* através das cepas isoladas neste estudo.

REFERÊNCIAS

- ABEYSUNDARA, P. D. A.; DHOWLAGHAR, N.; NANNAPANENI, R.; et al. Growth and biofilm formation by *Listeria monocytogenes* in cantaloupe flesh and peel extracts on four food-contact surfaces at 22 °C and 10 °C. **Food Control**, v. 80, p. 131–142, 2017.
- ADDINSOFT. XLStat Versão 19.4. , 2017.
- AHMED, O. M.; PANGLOLI, P.; HWANG, C. A.; et al. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in retail ready-to-eat meat and poultry products related to the levels of acetate and lactate in the products. **Food Control**, v. 52, p. 43–48, 2015.
- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; LEONG, D.; HICKEY, B.; BEAUFORT, A.; JORDAN, K. The challenge of challenge testing to monitor *Listeria monocytogenes* growth on ready-to-eat foods in Europe by following the European Commission (2014) Technical Guidance document. **Food Research International**, v. 75, p. 233–243, 2015.
- AMAJOUD, N.; LECLERCQ, A.; SORIANO, J. M.; et al. Prevalence of *Listeria* spp. and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from food products in Tetouan, Morocco. **Food Control**, v. 84, p. 436–441, 2017.
- ANDRADE, R. R.; SILVA, P. H. C.; SOUZA, N. R.; et al. Occurrence and differentiation of *Listeria* spp. in “hot dog” sausages sold in bulk and ground beef samples marketed in the federal district, Brazil. **Ciencia Rural**, v. 44, n. 1, p. 147–152, 2014.
- ARAÚJO, P. C. C.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO, J. C. A. P. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de Carne de Peru Comercializados Na Cidade De Niterói-Rj-Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30(1), n. December 2001, p. 19–25, 2002.
- DEN BAKKER, H. C.; WARCHOCKI, S.; WRIGHT, E. M.; et al. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 6, p. 1882–1889, 2014.
- BARBUDDHE, S., HAIN, T. & CHAKRABORTY, T. (2008). Comparative Genomics and Evolution of Virulence. In Liu, D., **Handbook of Listeria monocytogenes**. New York: CRC Press.
- BARRE, L.; ANGELIDIS, A. S.; BOUSSAID, D.; et al. Applicability of the EN ISO 11290-1 standard method for *Listeria monocytogenes* detection in presence of new *Listeria* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 281–287, 2016.
- BARROW, G.I. AND FELTHAM, R. K. A. **Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria**. 3ª Ed ed. Cambridge, UK, 1993.

BERSOT, L. D.; GILLIO, C.; TAVOLARO, P.; et al. Behaviour of L-Monocytogenes in Sliced, Vacuum-Packed Mortadella. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 514–516, 2008.

BERTSCH, D.; RAU, J.; EUGSTER, M. R.; et al. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART2, p. 526–532, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001a. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro 2004. A Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial da União**.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003c. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. **Diário Oficial da União**.

BRASIL. Casa Civil. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial da União**.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Presunto. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p.7, 3 ago. 2000. Seção 1

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22, de 24 de novembro de 2005. Regulamento Técnico para Rotulagem de Produtos de Origem Animal Embalado. **Diário Oficial da União**.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de Agosto de 2003. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**.

BRASILEIRO, I. S.; BARBOSA, M.; IGARASHI, M. C.; et al. Use of growth inhibitors for control of *Listeria monocytogenes* in heat-processed ready-to-eat meat products simulating post-processing contamination. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 7–13, 2016.

BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D.; HITCHENS, A.P. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: The William and Wilkins Co., 60 p., 1948

BRESSAN, M. C.; LODI, F.; FERREIRA, M. W.; et al. Influência da embalagem na vida útil de presuntos fatiados. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 2–7, 2007.

CESAR, Alessandra Paro R. et al. *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in the production of hot dog type sausages. **Ciência Animal Brasileira**, [S.l.], v. 12, n. 2, p. 339-352, feb. 2011.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. **Multistake Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado**. Outbreak Highlights, August 27, 2012 (FINAL Update Addendum). Disponível em: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html> Acesso em 03/04/2014.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2015, Annual Report**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2017. Disponível em: <https://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/> Acessado em 11/09/17.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention (2017). **PulseNet**. Disponível em : <https://www.cdc.gov/pulsenet/index.html> Acessado em 14/10/2017

CHARLIER, C.; CRETENET, M.; EVEN, S.; LE LOIR, Y. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 30–39, 2009.

COELHO, M. C.; SILVA, C. C. G.; RIBEIRO, S. C.; DAPKEVICIUS, M. L. N. E.; ROSA, H. J. D. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 53–59, 2014.

COLLINS, M. D., WALLBANKS, S., LANE, D. J., SHAH, J., NIETUPSKI, R., SMIDA, J., DORSCH, M. & STACKEBRANDT, E. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on 74 reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 41(2), 240-6.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: UM AGENTE INFECCIOSO AINDA POUCO CONHECIDO NO BRASIL. **Alim Nutr**, v. 19, n. 03, p. 195–206, 2008.

D'AMICO, D.J.; DONNELLY, C.W. Detection, isolation and incidence of *Listeria* spp. in small-scale artisan cheese processing facilities: a methods comparison. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 72, n. 12, p. 2499-2507, 2009.

DEEGAN, L. H.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1058–1071, 2006.

DE MARTINIS, E. C. P.; PÚBLIO, M. R. P.; SANTAROSA, P. R.; FREITAS, F. Z. Antilisterial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated From Vacuum- Packaged Brazilian Meat and Meat Products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 32–37, 2001.

EFSA. European Food Safety Authority The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. **EFSA Journal**, 14(12), 4634., 2017

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2016.4634/full> Acessado em: 30/09/17

FAI, A. E. C.; DE FIGUEIREDO, E. A. T.; VERDIN, S. E. F.; et al. [Salmonella sp and Listeria monocytogenes in fully cooked ham commercialized in supermarkets of Fortaleza (CE, Brazil): risk factor for public health]. **Ciencia & saude coletiva**, v. 16, n. 2, p. 657–662, 2011.

FERESUT, S. B.; JONES, D. Taxonomic Studies on *Brochothrix*, *Erysipelothrix*, *Listeria* and Atypical *Lactobacilli*. *Journal of General Microbiology*, 134, 1165-1183, 1998.

FDA/FSIS. Food and Drug Administration / Food Safety and Inspection Service / US. Department of Agriculture. Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health From Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods, 2003. Disponível em: www.fda.gov/downloads/food/foodscienceresearch/ucm197330.pdf Acessado em 29/09/2017

FRASER, J. A.; SPERBER, W. H. Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 10, p. 762–765, 1988.

FRIEDLY, E. C.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S.; et al. Identification of *Listeria innocua* surrogates for *Listeria monocytogenes* in hamburger patties. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 4, p. 174–178, 2008.

GALVÃO, N. N.; CHIARINI, E.; DESTRO, M. T.; DE AGUIAR FERREIRA, M.; NERO, L. A. PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. **Meat Science**, v. 92, n. 4, p. 635–643, 2012.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. BEN. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1-2, p. 51–70, 2007.

GÄNZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, n. Figure 2, p. 106–117, 2015.

GEERAERTS, W.; POTHAKOS, V.; DE VUYST, L.; LEROY, F. Diversity of the dominant bacterial species on sliced cooked pork products at expiration date in the Belgian retail. **Food Microbiology**, v. 65, p. 236–243, 2017.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. 3ª ed. Barueri, São Paulo: Manole; 2008. Agentes bacterianos de toxinfecções; p.277-356.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HEBRAUD, M.; et al. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**, v. 97, n. 3, p. 289–309, 2014.

GILOT, P.; CONTENT, J. by PCR Assays Targeting a Gene Encoding a Fibronectin-Binding Protein. , v. 40, n. 2, p. 698–703, 2002.

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, n. 4. p. 559-569, 2003.

GRAVES, L. M.; HELSEL, L. O.; STEIGERWALT, A. G.; et al. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1280–1288, 2010.

HALTER, E. L.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART2, p. 641–647, 2013.

HAMMER, Ø., HARPER, D. A.T. and RYAN, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1):9 pp.

HAVELAAR, A. H.; BRUL, S.; DE JONG, A.; et al. Future challenges to microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. SUPPL. 1, p. S79–S94, 2010.

ICMSF- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. A simplified guide to understanding and using food safety objectives and performance objectives, 2006. Disponível em:

<http://www.icmsf.org/pdf/FSO%20Objectives/GuiaSimplificadoEnglish.pdf>

Acessado em 28 de setembro de 2017.

ISO, 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*.—part 1: Detection method (ISO 11290-1:1996)

ISO, 2004a. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*.—part 1: Detection Method, Amendment 1:2004. Modification of the Isolation Media and Haemolysis Test (ISO 11290-1:2004)

ISO, 2004b. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*.—part 2: Enumeration method (ISO 11290-2:2004)

IVANEK, R.; GRÖHN, Y. T.; TAUER, L. W.; WIEDMANN, M. The cost and benefit of listeria monocytogenes food safety measures. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 7-8, p. 513–523, 2004.

JAY, J.M.; LOESSNER, M., GOLDEN, D.A. Modern Food Microbiology 7th Edition, Springer, New York, NY, USA, 790 p., 2005.

KAPETANAKOU, A. E.; KARYOTIS, D.; SKANDAMIS, P. N. Control of Listeria monocytogenes by applying ethanol-based antimicrobial edible films on ham slices and microwave-reheated frankfurters. **Food Microbiology**, v. 54, p. 80–90, 2016.

KARLI, A.; SENSOY, G.; UNAL, N.; et al. Ventriculoperitoneal shunt infection with Listeria innocua. **Pediatrics International**, v. 56, n. 4, p. 621–623, 2014.

KELLS, J.; GILMOUR, A. Incidence of Listeria monocytogenes in two Milk processing environments, and assessment of Listeria monocytogenes blood agar for isolation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.91, n.2, p.167-174, 2004

KESKINEN, L. A.; TODD, E. C. D.; RYSER, E. T. Impact of bacterial stress and biofilm-forming ability on transfer of surface-dried Listeria monocytogenes during slicing of delicatessen meats. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 3, p. 298–304, 2008.

KOCOT, A. M.; OLSZEWSKA, M. A. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by Listeria monocytogenes in a food processing context. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 47–57, 2017.

LANG HALTER; E.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, 641-647, 2013

LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; et al. Listeria rocourtiae sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 2210–2214, 2010.

LECLERCQ, A.; MOURA, A.; TESSAUD RITA, N.; BRACQ DIEYE, H.; THOUVENOT, P.; VALES, G.; MAURY, M.; AGUILHON, C.; LECUIT, M. Listeria thailandensis sp. nov. Isolated From food in Thailand. Problems of Listeriosis, **Isopol XIX**, 14–17 June 2016, Paris, France.

LEWUS, C. B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meatt. , v. 57, n. 6, p. 1683–1688, 1991.

LIU, S. Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 115–131, 2003.

LOKERSE, R. F. A.; MASLOWSKA-CORKER, K. A.; VAN DE WARDT, L. C.; WIJTZES, T. Growth capacity of *Listeria monocytogenes* in ingredients of ready-to-eat salads. **Food Control**, v. 60, p. 338–345, 2016.

LUBER, P.; CRERAR, S.; DUFOUR, C.; et al. Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization - Recommendations for improved prevention and control. **Food Control**, v. 22, n. 9, p. 1535–1549, 2011.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.; WHITMAN, W. B. (2009). Family III. Listeriaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (2nd Edition), Georgia: Springer, 2009

MANO, S. B.; ANTONIO, J.; FERNANDO, G. Aumento Da Vida Útil E Microbiologia Da Carne Suína. , v. 22, n. 1, p. 1–10, 2002.

MARTINS, E. A.; LEAL GERMANO, P. M. *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, n. 2, p. 297–302, 2011.

MATARAGAS, M.; DROSINOS, E. H.; METAXOPOULOS, J. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2°C. **Food Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 259–265, 2003.

MURRAY, E.G.D.; WEBB, R.A.; SWANN, M.B.R. A Disease of rabbits characterised by a large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). **J. Pathol. Bacteriol.**, v.29, p.407-439, 1926.

MS. Ministerio da Saude, Secretaria de Vigilância em Saude - SVS Vigilância epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos - VE/DTA 2000-20015. Disponível em: <http://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-janeiro-de-2016/> Acesso: em 19/07/2016.

NEWELL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; et al. Food-borne diseases - The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. SUPPL. 1, p. S3–S15, 2010.

NGUYEN, U. T.; BURROWS, L. L. DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, p. 26–32, 2014.

ORSI, R. H.; WIEDMANN, M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5273–5287, 2016.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. 2.ed. Goiânia: Ed. UFG, 2001. 487p. v.2.

PEREIRA, R. N.; VICENTE, A. A. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. **Food Research International**, v. 43, n. 7, p. 1936–1943, 2010.

RAMOS, E.M.; GOMIDE, L.A.M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Vol. 1, 1.ed. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 2008

Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia L 338**. Parlamento Europeu e do Conselho. Bruxelas.

ROCOURT, J.; GRIMONT, P.A.D.: *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**., 1983, **33**, 866-869.

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. third Edition, Boca Raton: CRC Press, 2007. Chap. 1, p. 1-20.

RYSER, E.T; DONEY, C.W. *Listeria* In: DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of methods the microbiological examination on foods. 4th.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. Chap. 36, p.343-356

SALLEN, B., RAJOHARISON, A., DESVARENNE, S., QUINN, F. & MABILAT, C. (1996). Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 46 (3), 669-74.

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI, A.; FERNANDAS, S. A.; TAVECHIO, A. T.; DO AMARAL, L. A. Salmonella em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 39–42, 2000.

SAUDERS, B. D.; OVERDEVEST, J.; FORTES, E.; et al. Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4420–4433, 2012.

SEELIGER, H.P.R. Apathogen listerien: *L. innocua* sp. n. Validation List no. 10. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **33**, 438-440, 1983

SEELIGER, H.P.R.; ROCOURT, J.; SCHRETTENBRUNNER, A.; GRIMONT, P.A.D.; JONES, D.: *Listeria ivanovii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **34**, 336-337, 1984.

SIQUEIRA, M. G. F. .; SILVA, J. C. .; LUCIO, E. C.; et al. Detection of *Listeria* spp . in food handling areas of retail food stores in the state of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, e2016138, 2017.

SILVA, N.; et al. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 4^o Edição. São Paulo - SP. Editora: Varela, 2010.

TAHOUN, A. B. M. B.; ABOU ELEZ, R. M. M.; ABDELFATAH, E. N.; et al. *Listeria monocytogenes* in raw milk, milking equipment and dairy workers: Molecular characterization and antimicrobial resistance patterns. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, p. 264–270, 2017.

TAUXE, R. V.; DOYLE, M. P.; KUCHENMÜLLER, T.; SCHLUNDT, J.; STEIN, C. E. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. SUPPL. 1, p. S16–S28, 2010.

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

TODESCHINI, G. et al. A case of *Listeria murray/grayi* bacteremia in a patient with advanced Hodgkin's disease. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, V.17, p.808-810, 1998.

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

VERCAMMEN, A.; VANOIRBEEK, K. G. A.; LURQUIN, I.; et al. Shelf-life extension of cooked ham model product by high hydrostatic pressure and natural preservatives. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 4, p. 407–415, 2011.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, n. 2, p. 149–164, 2004.

VITAS, A. I.; GARCIA-JALON, V. A. E. I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 349–356, 2004.

WEISS, J.; GIBIS, M.; SCHUH, V.; SALMINEN, H. Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 196–213, 2010.

WELLER, D.; ANDRUS, A.; WIEDMANN, M.; DEN BAKKER, H. C. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 286–292, 2015.

WORAPRAYOTE, W.; MALILA, Y.; SORAPUKDEE, S.; et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **Meat Science**, v. 120, p. 118–132, 2016.

ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; CONTER, M.; IANIERI, A. Mineral composition of Italian salami and effect of NaCl partial replacement on compositional, physico-chemical and sensory parameters. **Meat Science**, v. 86, n. 3, p. 742–747, 2010.

ZHU, X.; ZHANG, R.; CHU, F.; HE, Z.; LI, J. A flexsim-based optimization for the operation process of cold-chain logistics distribution centre. **Journal of Applied Research and Technology**, v. 12, n. 2, p. 270–278, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – RESULTADOS GERAIS DAS CARACTERIZAÇÕES FENOTÍPICAS

APENDICE 1 – CLASSIFICAÇÃO GERAL DAS FREQUÊNCIAS DE <i>LISTERIA</i> SPP. CONSIDERANDO AS VARIÁVEIS METODOLOGIA, MEIO, CATALASE, GRAM, XILOSE, RAMNOSE, DEXTROSE, MANITOL, BETA-HEMOLISE, MOTILIDADE E ESPÉCIES DE <i>LISTERIA</i>															
VARIÁVEL	CATEGORIA		AI		AV		BI		BV		CI		CV		
METODOLOGIA	CONTAGEM		T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	
MEIO	PRESENÇA/AUSENCIA		0	15	96	162	1	0	92	150	0	0	19	47	
	ALOÁ OXA		0	3	24	26	6	0	32	31	9	0	18	35	
CATALASE	+		0	18	111	177	1	0	107	168	6	0	25	62	
	-		0	0	9	11	6	0	17	13	3	0	12	20	
GRAM	+		0	0	57	96	4	0	49	32	1	0	30	46	
	-		0	17	22	54	0	0	32	78	6	0	3	30	
XILOSE	+		0	16	79	149	1	0	80	101	6	0	32	76	
	-		0	1	0	1	3	0	1	9	1	0	1	0	
RAMNOSE	+		0	0	33	63	1	0	15	26	0	0	31	43	
	-		0	17	46	87	3	0	66	84	7	0	2	33	
DEXTROSE	+		0	14	70	144	4	0	81	93	7	0	32	76	
	-		0	3	9	6	0	0	0	17	0	0	1	0	
MANITOL	+		0	6	65	116	4	0	57	73	3	0	32	60	
	-		0	11	14	34	0	0	24	37	4	0	1	16	
β-HEMOLISE	+		0	11	32	64	0	0	56	55	5	0	31	57	
	-		0	6	47	86	4	0	25	55	2	0	2	19	
MOTILIDADE	+		0	1	8	38	0	0	12	17	1	0	30	33	
	-		0	16	71	112	4	0	69	93	6	0	3	43	
ESPECIE	+		0	0	23	31	2	0	29	32	4	0	31	36	
	-		0	17	56	119	2	0	52	78	3	0	2	40	
ESPECIE	<i>Listeria innocua</i>		0	0	16	20	0	0	12	6	0	0	0	0	
	<i>Listeria ivanovii</i>		0	0	0	2	0	0	12	9	0	0	30	33	
	<i>Listeria seeligeri</i>		0	0	0	2	0	0	12	9	0	0	30	33	
	<i>Listeria weishimeri</i>		0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cepa não confirmada		0	18	102	195	7	0	100	166	9	0	7	49	

FONTE: A autora (2017)