

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA E TERMORRESISTÊNCIA  
DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM SALSICHAS FORMULADAS, COM E SEM  
A ADIÇÃO DE LACTATO DE POTÁSSIO, EMBALADAS A VÁCUO, E  
ARMAZENADAS A -18 °C, 4 °C e 10 °C**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. John B. Luchansky (USDA/EUA)  
Co-orientador: Prof. Dr. Ernani S. Sant'Anna (UFSC/Brasil)

**ANNA CLAUDIA SIMAS PORTO**  
(MSc. Ciência dos Alimentos)

**FLORIANÓPOLIS-SC**  
**Março/2003**

PORTO, Anna Claudia Simas

Capacidade de sobrevivência e termorresistência de *Listeria monocytogenes* em salsichas formuladas, com e sem a adição de lactato de potássio, embaladas a vácuo e armazenadas a -18 °C, 4 °C e 10 °C. Anna Claudia Simas Porto. Florianópolis, 2003.

176p.: graf.; fig.; 29 cm

Tese Doutorado – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2003.

Orientador: Dr. John B. Luchansky (USDA/EUA)

Banca Examinadora: Dr. Ernani S. Sant'anna, Dra. Bernadette D. G. M. Franco, Dra. Mariza Landgraf, Dra. Cleide R. V. Batista, Dra. Roseane Fett.

Bibliografia

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Salsichas. 3. Lactato de potássio.

***"É preciso reviver o sonho e a certeza de que tudo vai mudar. É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão. O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem sabe ver."***

***Gabriel Garcia Márquez***

Com amor e carinho, dedico este trabalho aos meus pais, Sebastião e Alcionê, pelo amor incondicional, compreensão, incentivo e luta, exemplos de vida a seguir.

Com imensa gratidão, também ofereço este trabalho a minha irmã Lourdinha, minha maior amiga e incentivadora, pela força, pelo amor infinito e pelo entusiasmo.

To my love Bill, who has made my life something special...

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Dr. John B. Luchansky, pela oportunidade, sugestões e conhecimento compartilhados, apoio constante e amizade, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Ernani S. Sant'Anna, pela oportunidade, apoio constante e amizade, essenciais para a conclusão do Curso.

À Professora Dr. Bernadette D. G. M. Franco, pela ajuda oferecida, sugestões e apoio prestado.

À Professora Dr. Roseane Fett, pelo esforço e dedicação como Coordenadora do Programa de Pós-Graduação.

Ao United States Department of Agriculture (USDA), pela oportunidade e suporte financeiro, que possibilitaram a dedicação integral a este trabalho.

À CAPES e a UFSC pela oportunidade concedida para o aprimoramento da minha formação acadêmica.

À Professora Dr. Ana Carolina M. Arisi, pelo apoio prestado e amizade.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação, Sérgio de Souza, pela prestatividade.

Aos meus amigos do USDA, em especial, Jeff Call, John Phillips, Peggy Williamson, Morgan Wallace, Benne Marmer, Laura Wonderling, Orla Cloak, Caitriona Byrne, Lee, Angie e Nelly Osario, e Aaron Williams, pela paciência infinita, pelo apoio e pelas palavras de estímulo nos momentos de desânimo, pelo carinho especial, e principalmente pela torcida entusiasmada e pelo convívio inesquecível.

A Rachel Pearce por ter sido muito mais do que uma amiga, por ter sido minha família durante o tempo de completa ausência.

À Mrs. Imsick, pela lição de vida, pela adoção e pelo carinho especial.

A Melanie e Andrew Fett, pelo carinho, pela generosidade e pelo convívio amigo.

A Cristiane V. Helm, pelas longas “conversas”, pelos “empurrões”, pela amizade e carinho, e por também ter acreditado que chegaríamos no final deste longo caminho.

A Eunice C. Ilha, sempre presente, pela ajuda, apoio e compreensão nos momentos difíceis, e pelos momentos de alegrias compartilhados.

A Elza Meinert, pela força, presença constante, amizade e carinho, que muito contribuíram para chegar ao final desta pesquisa.

A Karen Marin, pelo carinho e convívio amigo.

A Regina C. O. Tôres, que, mesmo distante, esteve sempre presente, com uma palavra amiga e um carinho especial.

A Rosane M. D. Soares, pelo apoio, incentivo e amizade.

À Cinara P. Scharf, pela infinita força, pelo encorajamento, pelo carinho e amizade nos momentos difíceis e também pelas alegrias compartilhadas.

A Jaciara Z. Mazo, Ângela M. Fiorentini, Felipe O. Carioni, Naira Cavilha, Jadna Garcia, Fabiana Bortolini, Maude R. Borba, pelo apoio e amizade.

À Professora Lilia O. Carioni, pelo incentivo, força e carinho numa das etapas importantes deste caminho.

A Tia Santina, pelo constante incentivo, carinho e força, principalmente nos momentos de desânimo.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram da realização desta pesquisa.

Por último, em lugar especial no meu coração, aos meus sobrinhos, Rafael, Anna Carolina, Sophia e Isadora, razões da minha vida, ao meu irmão, Lincoln, e a meus cunhados, Joel e Juci, pela compreensão dos longos períodos de ausência, pelo amor, pelo carinho e pela torcida, minha eterna gratidão.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1 Sobrevivência de *L. monocytogenes* a 4 °C de salsichas inoculadas com (A) 20 e (B) 500 UFC por embalagem contendo 0,0% (n=5), 2,0% (n=3) e 3,0% (n=2) de lactato de potássio. Embalagens foram inoculadas com uma mistura (Scott A, H7776, 101M, F6854, e MFS-2). Barras verticais representam desvio padrão da média ..... 130
- FIGURA 2 Sobrevivência de *L. monocytogenes* a 10 °C de salsichas inoculadas com (A) 20 e (B) 500 UFC por embalagem contendo 0,0% (n=5), 2,0% (n=3) e 3,0% (n=2) de lactato de potássio. Embalagem foram inoculadas com uma mistura (Scott A, H7776, 101M, F6854, e MFS-2). Barras verticais representam desvio- padrão da média ..... 131
- FIGURA 3 Bandas padrão geradas por PFGE com a endonuclease de restrição *Sma*I de cepas de *L. monocytogenes*. As condições de eletroforese foram 14 °C, 200V, com pulsos variando de 4 a 40 s durante 22 horas. As setas denotam o tamanho aproximado do DNA determinado pelo marcador de DNA. Linhas: 1, MFS-2; 2, F6854; \*, marcador; 3, 101M; 4, H7776; 5, Scott A ..... 150
- FIGURA 4 Sucessão de cinco cepas de *L. monocytogenes* (Scott A; 101-M; H7776 ; F6854; e MFS-2) em salsichas formuladas sem (A) a adição de lactato de potássio e 3,0% (B) de lactato de potássio e embaladas a vácuo após 28 e 90 dias de estocagem a 4 °C. Os valores acima de cada coluna indicam a porcentagem de isolamento de cada cepa calculado pelo número total de cepas recuperadas para cada dia e para cada formulação de salsicha..... 152
- FIGURA 5 Inativação térmica de uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes* em salsichas embaladas a vácuo. Os dados apresentados são a composição de três repetições do número

de sobreviventes isolados seguido de aquecimento a 60 °C, 70 °C, 80 °C ou 90 °C em salsichas preparadas com e sem 2% de lactato de potássio e estocadas a -18 °C e 4 °C. Barras verticais representam +/- erro padrão.....

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1	Isolamento de <i>L. monocytogenes</i> em embalagens de salsichas	108
TABELA 2	Contagem de bactérias lácticas (BAL) ( $\log_{10}$ UFC por embalagem) e valores de pH em embalagens de salsichas estocadas a 4 °C por 90 dias.....	126
TABELA 3	Contagem de bactérias lácticas (BAL) ( $\log_{10}$ UFC por embalagem) e valores de pH em embalagens de salsichas estocadas a 10 °C por 60 dias.....	127
TABELA 4	Composição química de salsichas embaladas a vácuo preparadas sem e com 3,0% de lactato de potássio.....	128
TABELA 5	Cepas de <i>L. monocytogenes</i> utilizadas para inocular embalagens de salsichas preparadas comercialmente.....	148
TABELA 6	Entrevista informal com consumidores sobre as práticas de preparo e estocagem de salsichas em casa.....	169
TABELA 7	Tempo de redução decimal (valor D) e valor z para uma mistura de cinco cepas de <i>L. monocytogenes</i> em salsichas formuladas com e sem adição de lactato de potássio e estocadas a -18 °C ou 4 °C .....	171

## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo: i) realizar um estudo comparativo entre três métodos de recuperação de *Listeria monocytogenes* em salsichas embaladas a vácuo; ii) verificar a sobrevivência de *L. monocytogenes* em salsichas embaladas a vácuo, preparadas com ou sem adição de lactato de potássio durante estocagem a temperaturas de refrigeração e abusiva; iii) determinar a sobrevivência de *L. monocytogenes* em salsichas durante estocagem a temperaturas de refrigeração, empregando eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE); e iv) verificar os efeitos da temperatura e tempo de reaquecimento na sobrevivência de *L. monocytogenes* em salsichas preparadas com ou sem adição de lactato de potássio, durante estocagem em temperaturas de refrigeração e congelamento. Os resultados obtidos indicaram que: i) o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS foi mais sensível, bem como rápido e fácil, do que o método aprovado de enriquecimento de amostra do USDA/FSIS ou que o método de enxágüe de amostra do USDA/ARS em determinar a presença ou ausência de *L. monocytogenes*; ii) a adição de lactato de potássio como um ingrediente na produção de salsichas pode aumentar consideravelmente a segurança microbiológica de produtos cárneos prontos para consumo inibindo ou retardando a multiplicação de *L. monocytogenes* durante estocagem em temperatura de refrigeração ou abusiva; iii) cepa isolada de uma planta de processamento multiplicou melhor em salsichas embaladas a vácuo do que cepas isoladas de salsichas, salame e em clínica; e iv) a formulação do produto e temperatura/tempo de estocagem, ou combinações destas, não influenciaram significativamente a sobrevivência e/ou termorresistência de *L. monocytogenes* em salsichas nas temperaturas de reaquecimento testadas.

## ABSTRACT

The aim of this study was: i) to compare three methods for the recovery of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packaged frankfurters that were inoculated with a five-strain mixture of this pathogen; ii) to monitor the viability of a five-strain mixture of *L. monocytogenes* on frankfurters formulated with and without potassium lactate during storage at refrigeration and abuse temperatures; iii) to determine the persistence of the five-strain mixture of *L. monocytogenes* during storage at refrigeration temperatures by pulsed-field gel electrophoresis; and iv) to assess the effect of product formulation and storage times and temperatures on the viability of the five-strain mixture of *L. monocytogenes* after re-heating of frankfurters formulated with and without potassium lactate during storage at refrigeration and frozen temperatures. These data established that: i) the USDA/ARS package rinse method is markedly more sensitive, as well as demonstrably more rapid and facile than either approved USDA/FSIS product composite enrichment method or the USDA/ARS product composite rinse method in determining the presence or absence of *L. monocytogenes* and establishing the levels of the pathogen that may be on the surface of ready-to-eat meat foods such as frankfurters; ii) the addition of potassium lactate as an ingredient in frankfurters can appreciably enhance safety by inhibiting or delaying growth of *L. monocytogenes* during storage at refrigeration and abuse temperatures; iii) the origin of a *L. monocytogenes* strain may not be indicative of its particular adaptive ability, since in this study an environmental isolate was able to grow better in vacuum sealed packages of frankfurters than strain isolates from frankfurter, sausage and a patient; and iv) the product formulation and storage times/temperatures, or combinations thereof, did not significantly influence the viability and/or thermal inactivation of *L. monocytogenes* on frankfurters at the re-heating temperatures tested.

## SUMARIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>07</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>09</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
2.1 Características Gerais do Genêro <i>Listeria</i> .....	20
2.2 Descrição e Taxonomia de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	21
2.3 Ecologia de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	23
2.4 Características da Doença.....	24
2.5 Epidemiologia.....	25
2.6 Aspectos Regulatórios para <i>L. monocytogenes</i> em Carnes e Produtos Cárneos .....	27
2.7 Associação de <i>L. monocytogenes</i> em Carnes e Produtos Cárneos.....	28
2.8 Incidência e Sobrevivência de <i>L. monocytogenes</i> em Carnes e Produtos Cárneos.....	30
2.9 Métodos de Detecção, Identificação e Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	35
2.10 Controle de <i>Listeria monocytogenes</i> em Alimentos.....	46
2.10.1 Controle de <i>Listeria monocytogenes</i> por Ácidos orgânicos e seus sais.....	47
2.10.1.1 Modo de ação de ácidos orgânicos e seus sais.....	48
2.10.1.2 Modo de ação de ácidos orgânicos e seus sais sobre <i>L. monocytogenes</i> .....	50
2.10.3 Tratamento térmico no controle de <i>Listeria monocytogenes</i> em produtos cárneos.....	63
2.11 Referências.....	73
<b>3 CAPÍTULO I</b> .....	<b>97</b>
3.1 Título: Recovery of <i>Listeria monocytogenes</i> from vacuum-sealed packages of frankfurters: comparison of the U.S. Department of Agriculture (USDA)	

Food Safety and Inspection Service Product Composite Enrichment Method, the USDA Agricultural Research Service (ARS) Product Composite Rinse Method, and the USDA-ARS Package Rinse Method.....	98
3.2 Resumo .....	99
3.3 Abstract.....	100
3.4 Introdução.....	101
3.5 Material e Métodos.....	102
3.5.1 Preparo das cepas.....	102
3.5.2 Preparo e inoculação das salsichas embaladas a vácuo .....	103
3.5.3 Métodos de isolamento para <i>Listeria monocytogenes</i> .....	104
3.5.3.1 Métodos de isolamento para <i>Listeria monocytogenes</i> : método de enriquecimento do USDA/FSIS .....	104
3.5.3.2 Métodos de isolamento para <i>Listeria monocytogenes</i> : método de enxágüe da amostra do USDA/ARS .....	105
3.5.3.3 Métodos de isolamento para <i>Listeria monocytogenes</i> : método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS .....	105
3.5.4 Análise de salsichas adquiridas a varejo .....	106
3.5.6 Ribotipagem .....	106
3.5.7 Análise estatística .....	106
3.6 Resultados .....	107
3.6.1 Recuperação de <i>Listeria monocytogenes</i> inoculada em embalagens de salsichas .....	107
3.6.2 Isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i> em embalagens de salsichas adquiridas a varejo .....	109
3.7 Discussão .....	110
3.8 Referências .....	112
<b>4 CAPÍTULO II .....</b>	<b>114</b>
4.1 Título: Viability of a five-strain mixture of <i>Listeria monocytogenes</i> in vacuum-sealed packages of frankfurters, commercially prepared with and without 2.0 or 3.0% added potassium lactate, during extended storage at 4 °C e 10 °C.....	115
4.2 Resumo .....	116

4.3 Abstract .....	117
4.4 Introdução .....	118
4.5 Material e Métodos .....	120
4.5.1 Preparo das cepas .....	120
4.5.2 Preparo e inoculação das salsichas embaladas a vácuo .....	121
4.5.3 Análises microbiológicas .....	122
4.5.4 Análises físico-químicas .....	123
4.5.5 Análise estatística .....	123
4.6 Resultados .....	124
4.6.1 Isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i> e bactérias lácticas das embalagens de salsichas .....	124
4.6.2 População da microbiota natural e valores de pH e composição centesimal do fluido e/ou das salsichas .....	124
4.6.3 Sobrevivência de <i>Listeriae</i> em embalagens de salsichas estocadas a 4 °C e 10 °C.....	128
4.7 Discussão .....	132
4.8 Referências .....	136
<b>5 Capítulo III .....</b>	<b>141</b>
5.1 Título: Use of pulsed-field gel electrophoresis to monitor a five-strain mixture of <i>Listeria monocytogenes</i> in frankfurters.....	142
5.2 Resumo .....	143
5.3 Abstract.....	144
5.4 Introdução.....	145
5.5 Material e Métodos.....	146
5.5.1 Preparo e inoculação das salsichas embaladas a vácuo.....	146
5.5.2 Análises microbiológicas e análise estatística.....	146
5.5.3 Eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) .....	147
5.6 Resultados e Discussão.....	148
5.8 Referências.....	156
<b>6 Capítulo IV .....</b>	<b>158</b>
6.1 Título: Effect of re-heating on viability of a five-strain mixture of <i>Listeria monocytogenes</i> in vacuum-sealed packages of frankfurters, formulated with	

and without added 2.0% potassium lactate, following refrigerated or frozen storage.....	159
6.2 Resumo .....	160
6.3 Abstract.....	161
6.4 Introdução.....	162
6.5 Material e Métodos.....	164
6.5.1 Preparo das cepas.....	164
6.5.2 Preparo e inoculação das salsichas embaladas a vácuo .....	164
6.5.3 Tratamento térmico .....	165
6.5.4 Análises microbiológicas das salsichas .....	166
6.5.6 Análise estatística .....	166
6.6 Resultados .....	167
6.6.1 Enquete sobre a estocagem e preparo de salsichas em casa .....	167
6.6.2 Efeito da temperatura de refrigeração e congelamento na sobrevivência de <i>Listeria monocytogenes</i> em salsichas embaladas a vácuo.....	168
6.6.3 Efeito do reaquecimento na sobrevivência de <i>Listeria monocytogenes</i> em salsichas embaladas a vácuo e estocadas a - 18 °C e 4 °C.....	170
6.7 Discussão .....	174
6.8 Referências .....	176
<b>7 Considerações Finais .....</b>	<b>180</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes* é o agente etiológico e listeriose, uma doença contraída principalmente pelo consumo de alimentos contaminados. A taxa de mortalidade associada com a doença pode chegar a 30% em populações suscetíveis, como mulheres grávidas, recém-nascidos e indivíduos imunodeprimidos. O alto risco à saúde humana associado à listeriose fez que o United States Department of Agriculture/Food Safety Inspection Service (USDA/FSIS) estabelecesse o critério de tolerância zero para a presença de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo, incluindo salsichas, que foram consideradas como alimento de alto risco pelo *L. monocytogenes* Risk Assessment conduzido pelo FSIS.

No Brasil, as informações referentes à vigilância epidemiológica dos casos de listeriose assim como dados relativos ao isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos ainda são escassos. Além disso, a legislação brasileira, de acordo com a Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que fixa padrões microbiológicos para alimentos, não estabelece nem critério de obrigatoriedade para detecção nem níveis de tolerância de *L. monocytogenes* em alimentos, determinando somente que seja feita pesquisa do patógeno em queijos (BRASIL, 2001).

Entretanto, *L. monocytogenes* tem sido associada epidemiologicamente ao consumo de carnes e produtos cárneos. Recentemente, dois surtos de listeriose foram associados ao consumo de produtos cárneos prontos para consumo nos Estados Unidos. Segundo o Centers for Disease Control and Prevention, em 1998/1999, um surto foi associado a *L. monocytogenes* sorotipo 4b, isolada de salsichas e produtos cárneos de *delicatessen*, com 101 casos da doença e 21 mortes (CDCP, 1998); e, em 2000, um surto resultou em 29 casos de listeriose, quatro mortes e três abortos, associados ao sorotipo 1/2a isolado de produto cárneo de peru (CDCP, 2000).

No Brasil, um estudo conduzido por Hofer et al. (2000) caracterizou 3.112 cepas de *Listeria* spp., isoladas de diferentes fontes de infecção, como em seres humanos (7,9%) e em animais (7,6%), bem como de diferentes rotas de infecção, como alimentos (74,8%) e meio ambiente (9,5%), provenientes de diferentes regiões do país, no período de 1971 a 1997. Das cepas de *Listeria* spp. isoladas de alimentos, 89,9% (2.095 de 2.330) das amostras foram obtidas de produtos cárneos, industrializados ou não. Das amostras analisadas, *L. monocytogenes* compreendeu 24,8% (774 de 3.112) das cepas de *Listeria* isoladas e foi representada por dez sorotipos, sendo 11,3% (352 de 774) cepas do sorotipo 4b, 5,2% (162 de 774) cepas do sorotipo 1/2a e 4,7% (148 de 774) cepas do sorotipo 1/2b.

Várias pesquisas têm demonstrado a capacidade de alguns produtos cárneos de permitir a multiplicação do patógeno e de servir de veículo primário para a transmissão de listeriose. Os recentes surtos de listeriose envolvendo produtos cárneos impulsionaram diversas pesquisas visando ao controle de *L. monocytogenes* nesses produtos.

O controle de *L. monocytogenes* em produtos cárneos embalados a vácuo pode ser realizado por meio de intervenções físicas e químicas, como estocagem a baixa temperatura e uso de aditivos alimentares visando manter a qualidade microbiológica e prolongar a vida de prateleira desses produtos. Porém, *L. monocytogenes* pode multiplicar-se em ampla faixa de pH, de concentrações de sal, de temperatura e de atividade de água, e somente a aplicação dessas intervenções pode não ser eficiente para eliminar *L. monocytogenes* em caso de pós-contaminação. A aplicação de calor pode vir a ser um método eficiente para redução dos níveis de *L. monocytogenes* em alimentos após o processamento.

Contudo, existe pouca informação sobre o comportamento de *L. monocytogenes* em salsichas submetidas a estocagem prolongada sob temperatura de refrigeração ou abusiva. Logo, a avaliação da sobrevivência e da termorresistência de *L. monocytogenes* em salsichas formuladas com aditivos alimentares com propriedade bacteriostática ou bactericida, como lactato de potássio, pode fornecer dados para o estabelecimento de normas de preparo que

possam assegurar a qualidade microbiológica do produto e, assim, diminuir o risco de listeriose.

O presente trabalho teve por objetivo:

1) comparar a eficiência do método de enriquecimento do USDA/FSIS com métodos como, o método de enxágüe de amostra do USDA Agricultural Research Service (ARS) e o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA Agricultural Research Service (ARS), para isolamento de *L. monocytogenes* em produtos cárneos prontos para o consumo;

2) avaliar a capacidade de sobrevivência de *L. monocytogenes* em salsichas embaladas a vácuo, com ou sem adição de lactato de potássio durante estocagem a 4 e 10 °C;

3) verificar a persistência de *L. monocytogenes* em salsichas durante estocagem a temperatura de refrigeração, empregando eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE); e

4) avaliar os efeitos da temperatura e tempo de reaquecimento na sobrevivência de *L. monocytogenes* em salsichas embaladas a vácuo, com ou sem adição de lactato de potássio, durante estocagem em temperaturas de refrigeração e de congelamento.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características Gerais do Gênero *Listeria*

Listeriose, doença causada por *Listeria*, foi observada em animais por Hulphers em 1911, quando o gênero era chamado de *Listerella*. A doença foi relatada em humanos pela primeira vez em 1929 e foi associada com doença perinatal em 1933 (JAY, 1996). A partir de 1940 o gênero passou a ser chamado de *Listeria* (JAY, 1996; KLIMA; MONTVILLE, 1995; WEHR, 1987).

A relação entre *Listeria* e outras bactérias permaneceu obscura até a década de 1970. A bactéria não era citada nas três primeiras edições do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey, publicadas em 1923, 1925 e 1930. Na edição de 1934 *Listeria* foi incluída na tribo *Kurthia*, da família *Corynebacteriaceae* (ROCOURT, 1999). A partir da oitava edição do Manual, *Listeria* foi considerada como um gênero com afiliação incerta e classificada juntamente com *Erysipelothrix* e *Cayophanon*, e em seguida na família *Lactobacilaceae* (LOVETT, 1989; ROCOURT, 1999). Por fim, em 1986, no Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey, *Listeria* foi classificada na seção de bacilos gram-positivos, regulares e não esporulados, juntamente com *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* e *Cayophanon* (HOLT et al., 1994; ROCOURT, 1999; SEELINGER; JONES, 1986).

Por vários anos, o gênero *Listeria* continha apenas uma espécie: *L. monocytogenes*. Posteriormente, foram incluídas as espécies *L. denitrificans*, em 1948, *L. grayi*, em 1966, *L. murrayi*, em 1971, *L. innocua*, em 1981, *L. welshimeri* e *L. seeligeri*, em 1983, e *L. ivanovii*, em 1985 (ROCOURT, 1999).

Vários marcadores quimiotaxonômicos têm sido utilizados na verificação da posição filogenética do gênero *Listeria*, que pertence ao grupo de bactérias gram-positivas de baixo conteúdo de G+C no DNA (<55%), reforçando a sua distinção do gênero *Corynebacterium* e a sua relação com bactérias lácticas (ROCOURT, 1999).

Análises filogenéticas e métodos de biologia molecular permitiram uma melhor observação da diversidade dentro do gênero *Listeria*, que contém seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi*, como evidenciado pelos valores de homologia de DNA, seqüência 16rRNA, propriedades quimiotaxonômicas, análise de enzima multilocus (DONNELLY, 2001; McLAUCHLIN, 1997; ROCOURT, 1999; RYSER; DONNELLY, 2001). *L. denitrificans* foi reclassificada para *Jonesia denitrificans*, e *L. murrayi* foi reclassificada como uma subespécie de *L. grayi* (JAY, 1996).

## 2.2 Descrição e Taxonomia de *Listeria monocytogenes*

O agente etiológico da maioria dos casos de listeriose em humanos é *L. monocytogenes*, um bacilo gram-positivo, pequeno, curto, de 0,4-0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 0,5-2  $\mu\text{m}$  de comprimento, com extremidades arredondadas, que pode apresentar forma cocóide ou filamentosa, em culturas com 2-3 dias (FARBER; PETERKIN, 1991; PHAN-THANH et al., 2000; LOVETT, 1989; DONNELLY, 1994), podendo ser observados isolados ou em cadeias curtas (ROCOURT, 1999; RYSER; DONNELLY, 2001). Conseqüentemente, os membros do gênero *Listeria* têm sido algumas vezes classificados como *Corynebacterium* spp., *Haemophilus influenza*, *Erysipelothrix* spp., pneumococos, estreptococos ou estafilococos (RYSER; DONNELLY, 2001).

*L. monocytogenes* multiplica-se em aerobiose ou anaerobiose e prefere ambientes microaerofílicos (ROCOURT, 1999). Possui rápida multiplicação na maioria dos meios bacteriológicos, crescendo bem em caldo infusão cérebro coração (BHI), caldo soja tripticase e caldo tripticase (JAY, 1996). Requer biotina, riboflavina, tiamina e aminoácidos como cisteína, glutamina, isoleucina e valina (JAY, 1996; ROCOURT, 1999). Em ágar nutriente, as colônias típicas de *Listeria* são cinza-azuladas, apresentando de 0,2 a 0,8 mm de diâmetro após 24 horas de incubação (RYSER; DONNELLY, 2001). As colônias, quando visualizadas a luz transmitida, em direção oblíqua, apresentam brilho azul-esverdeado (FARBER; PETERKIN, 1991).

*L. monocytogenes* é um patógeno psicotrófico que se multiplica geralmente em temperaturas que variam de -0,4 °C a 50 °C, com multiplicação ótima entre 30 e 37 °C (FARBER; PETERKIN, 1991; RYSER; DONELLY, 2001). Possui flagelos peritríquios, os quais dão ao microrganismo característica de motilidade em tombamento, e este comportamento ocorre somente em faixas restritas de temperatura (20 °C a 25 °C) (FARBER; PETERKIN, 1991; HOLT et al.; 1994; ROCOURT, 1999). Pode tolerar concentrações de 10% a 30% de cloreto de sódio e crescer a uma atividade de água de 0,90 (RYSER; DONELLY, 1999), dependendo de fatores que influenciam a multiplicação, como pH e temperatura (LOVETT, 1989). Estudos com *L. monocytogenes* demonstram que o patógeno multiplica-se em valores de pH que variam de 4,4 a 9,6, com pH ótimo de crescimento de 7,0 (RYSER; DONELLY, 1999; SCHUCHAT et al.; 1991).

O patógeno apresenta reação catalase positiva e oxidase negativa; expressa  $\beta$ -hemolisina, produzindo uma zona de clareamento em ágar sangue (BENEDICT, 1990; FARBER; PETERKIN, 1991; HOLT et al., 1994); produz ácido por fermentação de glicose, frutose, manose, galactose, celobiose, maltose, melezitose, trealose e ramnose, sem formação de gás; hidrolisa esculina, salicina, amigdalina e hipurato de sódio; apresenta teste vermelho metil positivo; produz amônia a partir da arginina; reage negativamente para produção de sulfeto de hidrogênio, indol e nitrato redutase; liquefaz gelatina; hidrólisa amido e uréia; reduz telurito; e é parcialmente inibido por 0,02% de azida e cianida (BENEDICT, 1990; JAY, 1996; RYSER; DONELLY, 1999).

Apesar de as espécies de *Listeria* serem fenotipicamente similares, elas podem ser diferenciadas pela produção de hemolisina, incluindo teste CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen) e análise de patogenicidade em ratos (HOLT et al.; 1994; McKELLAR, 1994; ROCOURT, 1988; SEELINGER; JONES, 1986; SCHUCHAT et al., 1991), e pela produção de ácido a partir de D-xilose, L-ramnose e manitol. A atividade hemolítica é a característica mais importante e a mais difícil na identificação de *L. monocytogenes* (HOLT et al.; 1994; RYSER; DONELLY, 1999). As espécies *L. ivanovii* e *L. seeligeri* foram associadas a pelo menos quatro casos

de listeriose humana. Entretanto, *L. seeligeri* é freqüentemente considerada como microrganismo não patogênico (KLIMA; MONTVILLE, 1995).

### 2.3 Ecologia de *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* encontra-se amplamente difundida em plantas, solo e água, sendo também encontrada em silagens, esgotos, resíduos de abatedouros, em leite de vacas saudáveis ou com mastite, e em fezes humanas e de animais (COLBURN et al., 1990; DONALD et al., 1995; FENLON, 1985; FENLON et al., 1996; FRANCES et al., 1991; WEIS; SEELIGER, 1975; WIEDEMAN et al., 1994). Tem sido isolada em bovinos, ovinos, caprinos, suínos e aves (WEHR, 1987; FARBER; PETERKIN, 1991; FENLON et al., 1999). Entretanto, o habitat primário para *L. monocytogenes* parece ser solo e vegetação, onde a bactéria possui uma existência saprofítica, com o solo servindo de reservatório para posteriores infecções transmitidas para animais e humanos (RYSER; DONNELLY, 2001).

Vegetação ou silagem deterioradas foram associadas como fonte de infecção em vários casos de listeriose em animais de fazenda, por favorecerem o desenvolvimento de *L. monocytogenes* e servirem de suporte para o patógeno se espalhar através da cadeia alimentar (FARBER; PETERKIN, 1991). A resistência do patógeno à diversidade do meio, aliada à capacidade de colonizar, multiplicar e sobreviver em equipamentos de plantas de processamento, faz com que *L. monocytogenes* desperte o interesse das indústrias de alimentos (FENLON, 1999).

Em animais, a taxa de portadores assintomáticos é de 1% a 5%, porém estudos recentes utilizando diferentes metodologias para isolamento de *Listeria* spp. têm mostrado essas taxas mais elevadas (FARBER; PETERKIN, 1991). Em humanos, a presença de *Listeria* spp. no excremento fecal varia de 0% a 77% (RYSER; DONNELLY, 1999), com aproximadamente 5% a 10% da população geral sendo portadora assintomática de *L. monocytogenes* (FARBER; PETERKIN, 1991).

## 2.4 Características da Doença

Dados epidemiológicos do Centers for Disease Control and Prevention (CDCP) indicam a ocorrência de aproximadamente 2.500 casos de listeriose e 500 mortes anualmente nos Estados Unidos (MEAD et al., 1999), com uma incidência da doença estimada em 4,4 casos por milhão de habitantes (TAPPERO et al., 1995).

Listeriose em humanos é freqüentemente vista como uma doença invasiva em grupo de risco bem definido, ocorrendo principalmente em mulheres grávidas, pessoas em idades extremas, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida, alcoolismo e cirrose, portadores de *diabetes mellitus*, doenças cardiovasculares e renais, carcinoma e outras doenças que afetam o sistema imunológico (FARBER; PETERKIN, 1991; RYSER; DONNELLY, 2001). O intestino humano apresenta-se como ponto de entrada de *L. monocytogenes* (LOVETT, 1989). A dose de infecção é desconhecida, mas supostamente baixa, com período de incubação variável, que pode ir de dias a semanas (SLUTSKER; SCHUCHAT, 1999), exibindo uma taxa de mortalidade de aproximadamente 30% para indivíduos do grupo de risco. Essa taxa pode chegar a 70% quando a doença se manifesta através de meningite (GELLIN; BROME, 1989; FARBER; PETERKIN, 1991; LOVETT; TWEDT, 1988).

Bacteremia é a manifestação mais comum da doença em adultos. Os pacientes apresentam geralmente sintomas como febre, mal-estar, fadiga e dor abdominal, enquanto, em indivíduos que apresentam o comprometimento do sistema nervoso central, a doença se manifesta com febre, fadiga, estado mental alterado, meningite, encefalite e abscessos. Em mulheres grávidas, a doença se manifesta com sintomas semelhantes aos da gripe, com febre, dores de cabeça e mialgia, podendo haver a contaminação do feto, dependendo do estágio da gestação. A infecção intra-uterina pode resultar em nascimento prematuro, aborto espontâneo, nascimento de natimorto ou septicemia neonatal. Em recém-nascidos, listeriose provoca problemas cardíacos e respiratórios, convulsões, vômito, granulomas e

nódulos em diferentes órgãos. Também pode causar artrites, osteomielites, septicemia com faringites e mononucleoses, abscessos na espinha e cérebro, e peritonites (RYSER; DONNELLY, 2001; RYSER; MARTH, 1991; LOVETT, 1989; FARBER; PETERKIN, 1991; SLUTSKER; SCHUCHAT, 1999).

## 2.5 Epidemiologia

*L. monocytogenes* é uma bactéria reconhecida como patogênica há mais de 75 anos, porém a infecção causada por esse microrganismo era considerada rara até o surgimento dos primeiros surtos na década de 80 (McLAUHLIN, 1997; NICKELSON; SCHMIDT, 1999). A fonte e a rota de infecção são geralmente desconhecidas. Entretanto, a recente associação de *L. monocytogenes* com vários surtos alimentares sugere que a contaminação de alimentos pode ser a principal fonte do microrganismo (FARBER; PETERKIN, 1991).

Em 1979, um surto de listeriose foi diagnosticado em 23 pacientes hospitalizados em Boston, Massachusetts, após a ingestão de alface, radiche e cenoura contaminados por *L. monocytogenes* sorotipo 4b servidos no hospital. Dos pacientes envolvidos no surto, 50% eram imunodeprimidos devido a câncer, quimioterapia ou tratamento com esteróides, apresentando sintomas de meningite ou septicemia (FARBER; PETERKIN, 1991). Em 1981, o consumo de salada de repolho previamente adubado com composto preparado com esterco de ovinos resultou em um surto de listeriose em Nova Scotia, Canadá. Foram registrados 34 casos de listeriose em mulheres grávidas, resultando em abortos espontâneos, natimortos e recém-nascidos doentes. Sintomas de meningite, septicemia e pneumonia foram observados em sete adultos que não apresentavam nenhum sintoma de imunodepressão. O surto resultou em uma taxa de mortalidade de 41%, e as cepas de *L. monocytogenes* isoladas dos pacientes e das embalagens fechadas do produto envolvido eram do sorotipo 4b (SCHLECH et al., 1983; SCHUCHAT et al., 1991).

Em 1983, um surto de listeriose foi causado pelo consumo tanto de leite com 2% de gordura quanto integral em Boston, Estados Unidos. Foram diagnosticados 49 casos e 14 óbitos, com uma taxa de mortalidade de 29%. Das 49 cepas isoladas para sorotipagem, 32 foram identificadas como sorotipo 4b. Embora a cepa *L. monocytogenes* responsável por este surto não tenha sido detectada no produto envolvido, análises posteriores revelaram que 12% do leite integral e 14% dos filtros de leite nas fazendas que distribuíam leite para as plantas de processamento apresentaram *L. monocytogenes* dos sorotipos 1a, 3b, e 4b (FLEMING et al., 1985, RYSER; DONNELLY, 2001). Em 1985, no sudeste da Califórnia, foram relatados 142 casos da doença e 48 mortes (33% de mortalidade), causados pela ingestão de queijo do tipo mexicano (queijo mole), produzido com leite contaminado ou pasteurizado inadequadamente (LINNAN et al., 1988; KLIMA; MONTVILLE, 1995). As cepas de *L. monocytogenes* do sorotipo 4b isoladas de paciente e queijo eram de fagotipos idênticos, e vários métodos de DNA confirmaram o envolvimento do produto no surto de listeriose (RYSER, 1999). A partir desse surto, a bactéria passou a ser reconhecida como um patógeno importante em alimentos (NICKELSON; SCHMIDT, 1999).

Durante o período de 1983 a 1987, um surto de listeriose devido ao consumo de queijo ocorreu em Vaud, Suíça. Foram notificados 122 casos, com uma taxa de mortalidade de 28% (BULA et al., 1994). Das cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 4b isoladas durante o período da epidemia, 85% foram isoladas do produto envolvido (ROCOURT, 1992). Em 1991, um surto de listeriose em humanos ocorreu na Inglaterra após o consumo de patê (McLAUHLIN et al., 1991). Em 1992, seis casos (um fatal) da doença ocorreram na Noruega, seguidos ao consumo de carnes fatiadas prontas para consumo contaminadas com *L. monocytogenes* sorotipo 1/2 (BREDHOLT et al., 1999). Na França, 297 casos e 63 óbitos ocorreram devido ao consumo de geléia de língua de porco contaminada com *L. monocytogenes* sorotipo 4b (GOULET et al., 1993). Testes moleculares mostraram que cepas isoladas do produto tinham o mesmo perfil genético das cepas isoladas dos pacientes (ROCOURT, 1992). Consumo de patê também foi associado a casos epidêmicos de listeriose no Reino Unido e na República da Irlanda entre 1985 e 1989. De um total

de 823 casos, 366 revelaram uma significativa associação entre o consumo de patê e infecção causada por *L. monocytogenes*. Dois subtipos de *L. monocytogenes* sorotipo 4b (fagotipo 6, 7 e sorotipo 4bX) provocaram a maioria dos casos (30% a 54%). Dos subtipos envolvidos, 96% das cepas foram isoladas de patê produzido em uma única planta de processamento (DONNELLY, 1994; ROBERTS, 1994).

Em julho de 1994, 52 indivíduos apresentaram sintomas de listeriose de nove a 32 horas após a ingestão de leite achocolatado em Illinois, Wisconsin e Michigan (DALTON et al., 1997). Diferentemente dos casos acima mencionados, neste surto ocorreram apenas sintomas gastrointestinais, com somente quatro hospitalizações. A cepa epidêmica *L. monocytogenes* sorotipo 1/2b foi isolada dos galões fechados que indicaram baixo padrão de qualidade, com níveis de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/ml (RYSER; DONNELLY, 2001).

De agosto 1998 a fevereiro de 1999, ocorreu o segundo maior surto de listeriose na América do Norte, provocado pelo consumo de salsichas. Foram relatados 101 casos em 22 estados, com 12 mortes, três abortos e 79 casos da doença (CDCP, 1998). A cepa epidêmica de *L. monocytogenes* era do sorotipo 4b, a qual tem sido responsável pela maioria dos surtos de listeriose (DONNELLY, 1994). Entretanto, quando a cepa foi submetida à caracterização por perfil de DNA, verificou-se que o microrganismo pertencia ao padrão de eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) tipo E, que é raramente encontrado (RYSER; DONNELLY, 2001). Em 2000, um surto de listeriose resultou em 29 casos da doença, quatro mortes e três abortos, em dez estados americanos, tendo como veículo de contaminação carne de peru (CDCP, 2000).

## **2.6 Aspectos Regulatórios para *L. monocytogenes* em Carnes e Produtos Cárneos**

Aspectos regulatórios em relação a *L. monocytogenes* em alimentos variam de acordo com o país (TOMPKIN et al., 1991). Por exemplo, nos Estados Unidos,

agências federais responsáveis pela saúde pública e proteção alimentar estabeleceram o Programa Tolerância Zero em alimentos prontos para consumo, ou seja, presença de menos de uma unidade formadora de colônia (UFC) de *L. monocytogenes* em 25 gramas de alimento para alimentos prontos para consumo (SHANK et al., 1996). Os parâmetros regulatórios do United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS) são os mesmos dos do Food and Drug Administration (FDA) e estão baseados na definição de adulteração, ou seja a presença de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo é considerada intencional. Por essa razão, resultados para *Listeriae* nesse tipo de produto indicam adulteração, sendo objetos de apreensão, condenação ou outra medida regulatória apropriada (SHANK et al., 1996). Já no Brasil, de acordo com o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, anexo da Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, não existe critério estabelecido para o patógeno em carnes, não havendo exigência de análise para detecção de *L. monocytogenes* em carnes ou produtos cárneos prontos para consumo (BRASIL, 2001).

## **2.7 Associação de *L. monocytogenes* em Carnes e Produtos Cárneos**

Em 1986 e 1987, o CDCP conduziu um estudo para verificar que tipo de alimento estava associado a 82 casos de listeriose, estimando-se que 20% dos casos esporádicos da doença nos Estados Unidos estavam associados a salsichas consumidas sem serem reaquecidas antes do consumo e ao consumo de frango mal cozido (TOMPKIN et al., 1991). Em 1987, o Food Safety Inspection Service (FSIS) considerou a possibilidade de que produtos cárneos processados poderiam conter *L. monocytogenes*, apesar de estes produtos não terem sido associados com surtos de listeriose em humanos (SHANK et al., 1996).

Foi então estabelecido o Programa de Monitoramento/Verificação do USDA/FSIS, cujo o objetivo era determinar a extensão da contaminação com *L. monocytogenes* em produtos cárneos cozidos e prontos para consumo, tanto

produzidos no país quanto importados (SHANK et al., 1996; FARBER; PETERKIN, 2001). Resultados obtidos neste programa durante 1993 e 1996 mostraram que, em geral, *L. monocytogenes* ocorre em baixa incidência (0% a 8,1%) em produtos cárneos cozidos e prontos para consumo (FARBER; PETERKIN, 2001). Salsichas de diâmetro reduzido mostraram uma incidência maior do patógeno do que a observada para salsichas de diâmetro maior, com incidências de 3,7% a 5,3% e 1,0% a 2,1%, respectivamente (FARBER; PETERKIN, 2001).

Em 1989, este programa foi intensificado devido à associação de salsichas de peru com casos de listeriose em humanos (BARNES et al., 1989). A partir desse ano, o Programa de Tolerância Zero foi estendido para produtos cárneos prontos para consumo, e para monitoramento do patógeno em plantas de processamento (SHANK et al., 1996). De 1990 a 1997, foram realizados pelo menos 12 *recalls* para produtos cárneos cozidos e prontos para consumo contaminados com *L. monocytogenes*, sendo sete para sanduíches preparados com produtos cárneos, três para presuntos e dois para salsichas. Os *recalls* de salsichas retiraram do mercado aproximadamente 1.400 kg do produto em dois estados americanos entre 1991 e 1992 (FARBER; PETERKIN, 2001). Em 1999, o USDA/FSIS realizou vários *recalls* em plantas de processamento de salsichas e carnes de *delicatessen*, onde coletivamente condenou mais de 250.000 quilos de produtos com possível contaminação de *L. monocytogenes*. O patógeno foi responsável por 50% (31 de 62) dos *recalls* para produtos cárneos prontos para consumo (FSIS/USDA, 2001).

O Canadá iniciou seu programa de monitoramento de *L. monocytogenes* em produtos cárneos processados e produtos prontos para consumo em plantas de processamento em 1987, mesmo período no qual o Health Protection Branch (HPB) iniciou programa similar para testar a presença de *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo em estabelecimentos não registrados (FARBER; HARWIG, 1996). Entre 1989 e 1997, foram realizados cerca de 20 *recalls* para produtos cárneos fermentados e ocorreu aproximadamente o mesmo número de *recalls* para sanduíches preparados com produtos cárneos, produtos cárneos fatiados, salsichas e produtos de *delicatessen* (FARBER; PETERKIN, 2001).

## 2.8 Incidência e Sobrevivência de *L. monocytogenes* em Carnes e Produtos Cárneos

Apesar de a presença de *L. monocytogenes* ser associada a uma ampla variedade de alimentos (FARBER; PETERKIN, 1991), os últimos surtos e casos esporádicos de listeriose em humanos têm sido associados a produtos cárneos prontos para consumo (CDCP, 1998; CDCP, 2000). Vários estudos realizados com diversos tipos de carnes e produtos cárneos mostraram que a incidência de contaminação pode variar significativamente (de menos de 1% a 90%) (HUDSON et al., 1992; JAY, 1996; JOHNSON et al., 1990; QVIST; LIBERSKI, 1991; TIWARI; ALDENRATH, 1990; WANG; MURIANA, 1994). A variação é devido a fatores como o método de detecção utilizado, o tamanho da amostra, o número de colônias individuais isoladas tomadas para confirmação de presença de colônias hemolíticas e a fonte da qual a amostra foi obtida (FARBER; PETERKIN, 1991; JOHNSON et al., 1990). Nesses estudos predominaram as cepas do sorotipo 1/2 (JAY, 1996; ROCOURT; COSSART, 1997).

Nos Estados Unidos, Duffy et al. (2001) verificaram uma alta incidência de *Listeria* spp. (41,9%) em produtos de carne suína comercializados a varejo. Foi observada uma alta incidência de *Listeria* spp. (41,9%), enquanto *L. monocytogenes* foi detectada em 19,8% das amostras (76 de 384), com mais frequência em carne moída do que em cortes de carne suína. Carne moída suína pré-embalada e/ou produtos do tipo salsicha apresentaram a maior incidência ( $P \geq 0,05$ ) para o patógeno. De acordo com os autores, as amostras de carne moída suína podem ter sido contaminadas devido à limpeza imprópria do moedor ou de equipamentos da planta de processamento.

A incidência de *L. monocytogenes* no Brasil em carne e produtos cárneos também tem sido estudada. Destro et al. (1991) determinaram a incidência de *Listeria* spp. em diferentes produtos cárneos, detectando *L. monocytogenes* em 75,4% das amostras analisadas. Sessenta e cinco por cento das amostras de carne

bovina moída, 82,4% das amostras de salsichas e 80% das amostras de lingüiça de carne suína estavam contaminadas com o patógeno. Assis et al. (2000) investigaram a incidência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em carne eqüina para consumo humano. Das 121 amostras testadas, 18,2% foram positivas para *Listeria* spp., e destas 7,4% foram positivas para *L. monocytogenes*. Bersot et al. (2001) avaliaram a presença de *L. monocytogenes* em 30 amostras de mortadelas adquiridas no mercado a varejo e observaram uma alta incidência do patógeno nesse tipo de produto. Das 30 amostras analisadas, 36,7% (11 de 30) foram positivas para *Listeria* spp., e 26,7% (8 de 11) foram positivas para *L. monocytogenes*.

Na Espanha, Simón e Ferrer (1998) determinaram a incidência e a contaminação inicial de *L. monocytogenes* em um total de 1.100 amostras de alimentos preparados e caracterizaram as cepas por sorotipo e fagotipo. *L. monocytogenes* foi isolada com mais freqüência (9,3%) em alimentos prontos para consumo do que em alimentos que necessitam algum tipo de preparo antes do consumo (2,9%). Estudo quantitativo conduzido com 773 amostras revelou que 1% das amostras que estavam contaminadas com *L. monocytogenes* apresentava números iniciais superiores a 100 UFC por grama. As cepas de *L. monocytogenes* pertenciam aos sorotipos 4b (36,3%), 1/2a (29,5%), 1/2b (22,7%) e 1/2c (11,3%).

A incidência de *L. monocytogenes* em carne e produtos cárneos comercializados na Espanha foi pesquisada por Campillo et al. (1999). O patógeno foi isolado em 11,4% das 175 amostras analisadas. Os níveis mais altos de contaminação inicial (24%) foram observados para as carnes moídas suína e bovina, com incidências de 16% em hambúrguer de carne bovina, 10% em carne de frango, 5% em salsicha e 5% em chouriço curado. *L. monocytogenes* não foi isolada em patê ou produto cárneo de *delicatessen*.

Cordano e Roucort (2001) avaliaram a incidência de *L. monocytogenes* em alimentos no Chile. Das 634 amostras de produtos cárneos analisadas, 521 eram produtos cárneos prontos para consumo e 113, salsichas cruas, com níveis de contaminação de 2,1% e 10,6%, respectivamente.

Farber et al. (1989a) realizaram um estudo para verificar a presença de *Listeria* spp. em vários produtos cárneos comercializados a varejo no Canadá. Foi observado que 77,3% (17 de 22) das amostras de carne bovina moída, 94,7% (18 de 19) das amostras de carne suína moída e 100% (3 de 3) das amostras de carne de vitela moída foram positivas para *L. monocytogenes*. De acordo com os autores, a alta porcentagem de amostras positivas obtidas pode ser atribuída à metodologia utilizada. Em outro estudo, Farber et al. (1989b) pesquisaram a presença de *L. monocytogenes* em produtos cárneos no Canadá. Segundo os autores, 56,3% (9 de 16) das amostras de coxas de frango, 86,4% (38 de 44) das amostras de carne bovina moída e 20% (6 de 30) das amostras de salame foram positivas, com a presença do patógeno; sendo 80% das amostras de carne e frango do estudo pertencentes ao sorotipo 1.

Na Austrália, Grau e Vanderlinde (1992) verificaram a incidência de *Listeria* spp. em produtos cárneos prontos para consumo comercializados no varejo durante um período de 12 meses. *Listeria* spp. foi detectada em 93 das 175 amostras analisadas (53%), e *L. monocytogenes* foi detectada em 80,6% (75 de 93) das amostras positivas.

Genigeorgis et al. (1990) avaliaram a incidência de *Listeria* spp. em asas e coxas frescas de peru comercializadas no varejo, e *L. monocytogenes* foi detectada em 20% das asas e em 13,3% das coxas.

A capacidade de alguns produtos cárneos permitirem a multiplicação ou sobrevivência de *L. monocytogenes* também vem sendo pesquisada (BUNCIC et al., 1991; GRAU; VANDERLINDE, 1992; McKELLAR et al. 1994; VELANI; GILBERT, 1990; YOUSEF et al., 1991). Várias explicações têm sido atribuídas à capacidade de *L. monocytogenes* sobreviver a longos períodos de estocagem sob temperaturas de refrigeração em carnes e produtos cárneos sem apresentar um aumento da população viável, como, por exemplo, a falta de nutrientes requeridos para a multiplicação do microrganismo ou efeito competitivo da microbiota natural (SHELEF, 1989; JOHNSON et al., 1988), efeito da atmosfera modificada, ingredientes, como a presença de ácidos orgânicos, NaCl, pH, presença de

bactérias lácticas e/ou bacteriocinas (BUCHANAN; PHILLIPS, 1990; CHEN; SHELEF, 1992; DE MARTINIS et al, 1997; LE MARC et al., 2002; NERBRINK et al., 1999; THAYER; BOYD, 1999; THAYER; BOYD, 2000; TIENUNGOON et al., 2000).

Farber e Daley (1994) avaliaram o potencial para a multiplicação de *Listeria* spp. em produtos cárneos naturalmente contaminados no Canadá. Os autores constataram a presença de *L. monocytogenes* em baixo nível inicial de contaminação, sendo o patógeno capaz de sobreviver, sem multiplicar-se, por longos períodos de estocagem a 4 °C em salsichas, presunto e carne de peito de peru. Das 101 amostras analisadas de 25 tipos de patês, sete foram positivas para *L. monocytogenes*, 12 positivas para *L. innocua*, uma positiva para *L. welshimeri* e uma para *L. ivanovii*. Também no Canadá, McKellar et al. (1994) avaliaram a multiplicação de *L. monocytogenes* em salsichas obtidas no varejo visando verificar o potencial de risco do produto. De um total de 61 amostras testadas, foi verificada a multiplicação do patógeno em 65,6% (40 de 61) das amostras, com aumento médio de 1,26 log<sub>10</sub> UFC/g durante 14 dias de estocagem a 5 °C.

Nissen e Holck (1998) estudaram a sobrevivência de *L. monocytogenes* em salame do tipo norueguês. O produto foi inoculado com baixa (3-4 log<sub>10</sub> UFC/g) e alta (5-7 log<sub>10</sub> UFC/g) concentração do patógeno. As amostras foram analisadas nos dias 0, 2, 6, 9, 16, 21, 46 e após 5 meses e meio, durante os estágios de fermentação, maturação e estocagem a 4 e 20 °C. Os resultados mostraram um aumento de 2,6 para 3,4 log<sub>10</sub> UFC/g, em amostras inoculadas com baixa concentração do patógeno a partir do segundo dia de fermentação. Após 21 dias, os números de *L. monocytogenes* apresentaram-se abaixo do limite de detecção de 150 UFC/g, e no 46º dia, poucas colônias foram detectadas. Os números de *L. monocytogenes*, quando o produto foi inoculado com alta concentração do patógeno, decresceram lentamente a partir de uma população de 5,5 log<sub>10</sub> UFC/g até o 21º dia, sendo após 46 dias, uma redução de apenas 1,0 ciclo logaritmico, de acordo com a temperatura de estocagem. Entretanto, após cinco meses e meio de estocagem, os números de *L. monocytogenes* estavam entre 4,2 a 4,4 log<sub>10</sub> UFC/g

quando o produto foi estocado a 4 °C, enquanto estavam abaixo do limite de detecção a 20 °C.

Shelef (1989) estudou a sobrevivência e a multiplicação de três cepas de *L. monocytogenes* em carne bovina moída e fígado bovino durante a vida de prateleira a 4 e 25 °C na presença da microbiota natural. Os resultados mostraram que as contagens de aeróbios totais foram  $> 8,0$  ou  $> 7,0 \log_{10}$  UFC/g para carne moída e fígado, respectivamente, após duas semanas de estocagem a 4 °C, enquanto, apesar de *L. monocytogenes* ter sido isolada nos dois produtos testados durante o período de estocagem de 40 dias (do estado de frescor à deterioração), a 4 e 25 °C, não foi observada a multiplicação do patógeno.

Glass e Doyle (1989), avaliando a sobrevivência de *L. monocytogenes* em diversos produtos cárneos processados durante estocagem a 4,4 °C, observaram uma multiplicação significativa do patógeno de mais 4  $\log_{10}$  UFC/g em salsichas durante nove semanas para uma determinada planta de processamento. Entretanto, um aumento menor que 1  $\log_{10}$  UFC/g foi observado para uma segunda planta de processamento testada. Os autores atribuíram a diferença observada na multiplicação do patógeno entre as plantas de processamento ao conteúdo de compostos fenólicos utilizados na formulação do produto.

O comportamento de *L. monocytogenes* em salsichas após a exposição do produto a dois diferentes sanitizantes alcalinos comerciais utilizados em plantas de processamento de carnes foi determinado por Taormina e Beuchat (2002). Salsichas formuladas com altos teores de gordura e de cloreto de sódio (AGAS) ou baixos teores de gordura e de cloreto de sódio (BGBS) e inoculadas com 2,0  $\log_{10}$  UFC/g, embaladas a vácuo, foram estocadas a -20, 4 ou 12 °C. Os autores não verificaram mudanças significativas nas populações do patógeno em salsichas estocadas a -20 °C durante 12 semanas. Para salsichas estocadas a 4 °C por seis semanas, a população das células aos sanitizantes alcalinos e das não expostas foi de aproximadamente 3,5  $\log_{10}$  UFC/g e 6,0  $\log_{10}$  UFC/g para salsichas AGAS e BGBS, respectivamente. A multiplicação das células adaptadas ao meio alcalino em ambos os tipos de salsichas foi lenta a 4 °C, e mais rápida a 12 °C.

Williams e Golden (2001) avaliaram a eliminação de *L. monocytogenes* termicamente injuriada a 4 e 20 °C por 31 dias em um produto alimentar simulando um produto cárneo fermentado embalado sob quatro diferentes atmosferas modificadas. No geral, foi observado que estocagem a 4 °C suportou melhor a sobrevivência do patógeno do que estocagem a 20 °C ( $P < 0,05$ ). O patógeno não submetido a injúria e estocado a 4 °C foi recuperado mais facilmente em ágar triptose fosfato do que *L. monocytogenes* subletalmente injuriada e estocada a 4 °C ( $P < 0,05$ ). A recuperação de *Listeria monocytogenes* subletalmente injuriada e estocada a 4 °C sob diferentes atmosferas foi da seguinte ordem:  $N_2 > CO_2-N_2 > ar > vácuo$  ( $P < 0,05$ ), enquanto a recuperação de *L. monocytogenes* não injuriada e estocada a 4 °C seguiu a ordem  $N_2 > CO_2-N_2 > vácuo > ar$  ( $P < 0,05$ ). A 20 °C, *L. monocytogenes* subletalmente injuriada e não injuriada sobreviveram melhor quando armazenadas em atmosferas de ar e vácuo do que em atmosferas de  $N_2$  e  $CO_2-N_2$ . A recuperação de *L. monocytogenes* subletalmente injuriada e estocada a 20 °C sob diferentes atmosferas foi da seguinte ordem:  $vácuo > ar > N_2 = CO_2-N_2$  ( $P < 0,05$ ), enquanto a recuperação de *L. monocytogenes* não injuriada e estocada 20 °C seguiu a ordem  $vácuo > ar > CO_2-N_2 > N_2$  ( $P < 0,05$ ). Os autores concluíram que a sobrevivência de *L. monocytogenes* em meio formulado para simular produtos alimentares fermentados é influenciada pelo *status* de injúria, atmosfera e temperatura de estocagem. Logo, fatores envolvidos na produção, estocagem e distribuição de produtos fermentados devem ser avaliados na determinação de estratégias de controle e detecção de *L. monocytogenes* nesses produtos.

## **2.9 Métodos de Detecção, Identificação e Enumeração de *Listeria monocytogenes***

Recentemente, nos Estados Unidos, produtos cárneos prontos para consumo foram associados como veículo de transmissão de listeriose em humanos. Análises epidemiológicas revelaram que a população de *L. monocytogenes* sorotipo 4b nas salsichas suspeitas do envolvimento no surto foi menor do que  $0,3 \log_{10}UFC/g$  e que, durante o mesmo período, plantas de processamento de produtos cárneos

prontos para consumo fizeram *recall* coletivo de mais de 250.000 quilos de produtos (DONNELLY, 2001; DONNELLY, 2002). Devido à regulamentação de tolerância zero aplicada para *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo no país, diversas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de melhorar a eficiência dos métodos de detecção e isolamento do patógeno (BEUMER et al., 1996; CAPITA et al., 2001; HAYES et al., 1992; WARBURTON et al., 1992; YU; FUNG, 1992).

A metodologia utilizada na detecção de *L. monocytogenes* em alimentos é de suma importância devido a população do patógeno ser geralmente encontrada em baixos níveis quando comparada à microbiota natural. Assim, a metodologia aplicada deve possibilitar a detecção de pelo menos uma célula viável de *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo ante o potencial de multiplicação do patógeno durante longos períodos de estocagem em temperatura de refrigeração, a esses produtos eventualmente serem consumidos sem o reaquecimento e a serem objeto de *recall* na presença de qualquer nível de contaminação (KNABEL, 2002).

Métodos tradicionais e métodos rápidos de detecção de *Listeria* utilizam uma etapa de enriquecimento da amostra para aumentar a população-alvo do microrganismo, que pode estar em baixos níveis, injuriada ou subletalmente danificada (DONNELLY, 2002; SILK et al., 2002). Logo, a detecção do patógeno em produtos alimentares pode ser limitada pela performance do meio de enriquecimento utilizado para a recuperação do microrganismo (SILK et al., 2002).

Esses métodos utilizam caldos de enriquecimento formulados com agentes seletivos que inibem a multiplicação da microbiota contaminante e, simultaneamente, permitem a proliferação de *Listeria* spp. (LOVETT, 1988a; DONNELLY, 2002; SILK et al., 2002). Entre os agentes seletivos comumente usados estão acriflavina, ácido naladixico, cloreto de lítio, moxalactam, ciclohexamida, nitrofurazona, tiocianato de potássio, telurito de potássio e feniletanol (BUCHANAN, 1990; BEUMER et al., 1996; DONNELLY, 2002; FLANDER; DONNELLY, 1994; SCHUCHAT et al., 1991). Porém, durante as diversas etapas no processamento de alimentos, visando à eliminação de *L. monocytogenes*, como tratamento térmico, congelamento, descongelamento,

desidratação, irradiação, sanitização ou uso de aditivos alimentares como ácidos orgânicos ou seus sais, pode não haver a eliminação total do patógeno, resultando em células injuriadas (WARBURTON et al., 1992; SMITH; ARCHER, 1988; KNABEL, 2002; DONNELLY, 2002; SILK et al., 2002). Entretanto, de acordo com SILK et al. (2002), microrganismos subletalmente danificados ou injuriados, incluindo *L. monocytogenes*, são sensíveis a agentes seletivos, podendo não ser detectados em metodologias que utilizem etapa de enriquecimento seletivo que possuam esses compostos em suas formulações.

Beumer et al. (1996) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de acriflavina e ácido naladixico na multiplicação de *Listeria* spp. Os resultados demonstraram que o uso de acriflavina no meio apresentou efeito direto e indireto no isolamento de *L. monocytogenes*. O aumento das concentrações de acriflavina no meio afetou a fase lag e o tempo de geração de *L. monocytogenes*, enquanto nenhum efeito foi observado para *L. innocua*. De acordo com os autores, acriflavina liga-se à proteína das amostras resultando em uma menor atividade do componente, e, por isso, em uma melhor multiplicação de *L. monocytogenes*. O ácido naladixico, nas concentrações testadas no meio de enriquecimento utilizado, não apresentou nenhum efeito significativo na multiplicação de *L. monocytogenes*. Os resultados mostraram que os agentes seletivos utilizados no protocolo de enriquecimento interferem na recuperação do patógeno em alimentos e em amostras de ambientes. Os autores concluíram que, para protocolos que utilizam baixa concentração de acriflavina em tampão adequado, ter-se-á um melhor desempenho no isolamento de *L. monocytogenes*.

Capita et al. (2001) compararam a sensibilidade, a seletividade e a eficácia dos meios polimixina B, acriflavina, cloreto de lítio, ceftazidina, esculina, D-manitol (PALCAM) e Oxford modificado (MOX) para isolamento de *Listeria* spp. de carne de frango, e observaram que o meio PALCAM foi mais seletivo ( $P < 0,001$ ) do que o meio MOX para o isolamento de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em carne de frango. Entretanto, diferenças significativas foram observadas ( $P < 0,001$ ) entre a eficácia dos meios testados. No meio PALCAM (esculina e manitol) foram isoladas

somente 1,04% (2 de 192) de cepas falso-positivas (todos *Bacillus* spp.), enquanto no meio MOX foram isoladas 11,46% (22 de 192) de cepas falso-positivas (principalmente *Enterococcus* spp.). Os meios de enriquecimento secundário não influenciaram no número de cepas falso-positivas obtidas.

Sheridan et al. (1994) estudaram os efeitos dos agentes seletivos utilizados em caldos de enriquecimento seletivos para isolamento de *Listeria* spp. em carnes. O uso de agentes seletivos aumentou significativamente a fase lag ( $P < 0,01$ ), porém com uma taxa de crescimento mais rápida ( $P < 0,01$ ). Os autores observaram diferença significativa na taxa de crescimento obtida para *L. monocytogenes* nos cinco caldos testados, sendo a taxa de crescimento significativamente ( $P < 0,001$ ) mais lenta no meio em meio não seletivo. A cinética de crescimento da microbiota natural da carne não foi afetada pela adição de agentes seletivos nos caldos UVM e PALCAM. O uso de água peptonada tamponada como caldo de enriquecimento não seletivo apresentou vantagem no isolamento de *Listeria* spp. em amostras de carne obtidas a varejo ( $n = 120$ ). A água peptonada tamponada apresentou maior eficiência no isolamento com menor tempo de incubação do que em meio de enriquecimento seletivo. Os autores observaram que, para amostras de carne, o meio de enriquecimento seletivo não teve nenhuma vantagem em comparação com o meio seletivo para ressuscitação e subsequente isolamento de *L. monocytogenes*.

O isolamento de cepas de *L. monocytogenes* estressadas em alimentos é de suma importância, uma vez que microrganismos subletalmente injuriados podem recuperar-se em alimentos e readquirir sua patogenicidade (KUHN; GOEBEL, 1999; McCARTHY, 1991; BESSE, 2002). Conseqüentemente, diversos pesquisadores têm estudado o comportamento de *L. monocytogenes* submetida a injúria em várias situações de estresse (WARBURTON et al., 1992; FLANDERS; DONNELLY, 1994; PETRAN; ZOTTOLA, 1989).

Cassiday et al. (1989) avaliaram dez meios seletivos para verificar a capacidade de isolamento e enumeração de *L. monocytogenes* submetidas ou não a injúria em presunto. Dos meios testados, o ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPMA) mostrou-se o viável para o isolamento e enumeração de *L.*

*monocytogenes* em presunto, uma vez que foi o meio que melhor inibiu a microbiota competitiva. De acordo com os autores, LPM contém moxalactam, um antibiótico de amplo espectro de ação, que inibe tanto bactérias gram-positivas como gram-negativas.

Silk et al. (2002) investigaram a cinética de crescimento de *L. monocytogenes* termicamente injuriadas em caldo base de enriquecimento para *Listeria* (BAM), caldo soja tripticase e caldo LRB como meios não seletivos e BAM e LRB adicionados com agentes seletivos, caldo de enriquecimento BCM, caldo Fraser e caldo University of Vermont (UVM) modificado como meios seletivos. Foram utilizados parâmetros de Gompertz para o cálculo da taxa de crescimento exponencial, duração da fase lag, tempo de geração, densidade máxima da população e tempo requerido para recuperação das células injuriadas. Os resultados mostraram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para as performances dos caldos em relação a duração da fase lag e a densidade máxima da população para células termicamente injuriadas e não injuriadas. Com exceção do caldo Fraser, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os caldos testados para o tempo requerido no isolamento das células injuriadas.

*L. monocytogenes* pode ser detectada e isolada em produtos alimentares e plantas de processamento por uma série de protocolos padrão ou métodos rápidos de detecção (DONNELLY, 2002). Um dos primeiros procedimentos para o isolamento de *Listeria* spp. em alimentos com alto grau de sensibilidade foi desenvolvido por Gray et al. em 1948, no qual as amostras são enriquecidas em caldo não seletivo por vários meses sob temperatura de refrigeração, com o objetivo de eliminar a microbiota competitiva. Entretanto, o método de enriquecimento a frio devido ao longo período de incubação não tem aplicação prática para a indústria de alimentos (LOVETT, 1988a; BUCHANAN, 1990; DEVER et al., 1993).

Entre os métodos comumente utilizados estão os protocolos desenvolvidos pelo USDA/FSIS para detecção de *Listeria* em carnes (McCLAIN; LEE, 1988; COOK, 1999) e pelo FDA para detecção de *Listeria* em leite e produtos lácteos (LOVETT, 1988b). O método do FDA é mais eficaz para o isolamento de baixa população de

*Listeria* spp. e para células estressadas ou injuriadas em alimentos com baixa população da microbiota competitiva, enquanto o método do USDA/FSIS, que utiliza duas etapas de enriquecimento, apresenta maior sensibilidade para isolamento de *Listeria* spp. em amostras com alta população da microbiota competitiva (NORTON, 2002).

O método do USDA/FSIS para isolamento de *L. monocytogenes* para carnes e frango foi desenvolvido por McClain e Lee em 1987, com duas etapas de enriquecimento com caldo indicador secundário, que detecta uma amostra negativa em três dias. Um grama da amostra é enriquecido em caldo de enriquecimento de *Listeria* (LBE) na etapa de enriquecimento primário, que posteriormente é transferido para *Listeria* caldo de enriquecimento II, que difere do primeiro na concentração de acriflavina-HCl como agente seletivo em 24 horas adicionais de incubação (DEVER et al., 1993). Os caldos LBE I e LBE II são também conhecidos como meio University of Vermont UVM I e UVM II (DEVER et al., 1993).

O método USDA/FSIS foi recentemente revisado (COOK, 1999) e difere do original pela reposição do caldo LBE II por caldo Fraser como meio de enriquecimento secundário, pela reposição do ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM) por ágar Oxford modificado (MOX), e pelo aumento do tamanho da amostra de um grama para 25 gramas.

De acordo com o método do USDA/FSIS (COOK, 1999), 25 gramas da amostra são homogêneos por 2 minutos em 225 ml de caldo UVM e incubados por  $22 \pm 2$  h a  $30^\circ\text{C}$ . Após o período de incubação, uma alíquota de  $0,1 \pm 0,02$  ml do caldo UVM é transferida para tubos contendo  $10 \pm 0,5$  ml de caldo de enriquecimento secundário Fraser e incubados por 26-28h e 48h a  $35^\circ\text{C}$ . Em seguida, uma alíquota de 200  $\mu\text{l}$  do caldo Fraser enegrecido é semeada por esgotamento em ágar seletivo MOX. Depois de 48h de incubação a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , cada placa de ágar seletivo MOX é examinada visualmente para verificar a presença de colônias com morfologia típica de *L. monocytogenes* rodeadas por zonas escuras.

O caldo Fraser utiliza o caldo LBE como base, mas é formulado com concentrações de acriflavina-HCL, cloreto de lítio e citrato de amônio férrico mais elevadas. O caldo Fraser torna-se enegrecido durante o período de incubação, e colônias de *Listeria* apresentam-se rodeadas por halos pretos em ágar MOX após 24-48h de incubação devido à hidrólise de esculina (DEVER et al., 1993).

Um estudo comparativo das versões modificadas dos métodos FDA (1988) e USDA (1989) foi realizado por Warburton et al. (1992) para detecção de *L. monocytogenes* injuriada e em baixa população em alimentos e meio ambiente. Em ambos os procedimentos foram utilizados os seguintes meios seletivos: ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM), ágar Oxford modificado (MOX), e ágar polimixina B, acriflavina, cloreto de lítio, ceftazidina, esculina e D-manitol (PALCAM). Também foram utilizados meio Oxford e caldo Fraser modificado (MFB) como meios de enriquecimento secundário. Os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os métodos modificados FDA e USDA; entretanto, quando comparados aos métodos de detecção originais, foram significativamente ( $P < 0,05$ ) mais eficientes no isolamento do patógeno. O pH do caldo de enriquecimento do método USDA (LBE I) apresentou valores próximos à neutralidade, o que favoreceu, principalmente, o isolamento de microrganismos injuriados. A utilização do caldo Fraser modificado aumentou significativamente ( $P < 0,05$ ) o isolamento de *L. monocytogenes* nos dois meios testados.

Yu e Fung (1992) compararam o procedimento de tubos Fung-Yu com motilidade e enzima Oxyrase™ com o método USDA/FSIS para isolamento de *Listeria*. De acordo com os autores, o procedimento de Fung-Yu foi tão sensível quanto o método USDA/FSIS, e com tempo de detecção reduzido de 26 a 48h devido à etapa de enriquecimento na motilidade do microrganismo e pelo uso da enzima Oxyrase™.

Kornacki et al. (1993) realizaram um estudo comparativo do isolamento de *L. monocytogenes* em caldo Fraser após 26 ou 48 horas de incubação. O patógeno foi isolado em 60 das 1.088 amostras de produtos cárneos e de plantas de processamento de produtos cárneos e lácteos. Os resultados mostraram que *L.*

*monocytogenes* foi isolada em duas amostras após 48 horas de incubação, mas não após 26 horas, resultando em 3,3% de resultados falso-negativos após 26 horas de incubação. O patógeno foi detectado em duas amostras após 26 horas de incubação, as quais não haviam escurecido. Uma incidência de 6,7% foi considerada pelo escurecimento do caldo Fraser. Quando foi realizada semeadura em superfície das amostras do enriquecimento primário em meio seletivo, foram recuperados 76,7% do número total das amostras positivas. *L. monocytogenes* não foi recuperada em oito caldos Fraser de enriquecimento primário testados positivamente.

Capita et al. (2000) avaliaram a eficácia de um modelo diferenciado (esculina-citrato amônio de ferro) em caldo Fraser como teste para verificar a presença de *Listeria* spp. em carne de frango. De acordo com os resultados obtidos, o sistema apresentou uma sensibilidade de 98,95% e uma especificidade de 40%. Segundo os autores, o sistema não foi eficiente para alimentos altamente contaminados com outros microrganismos que hidrolisam esculina, como no caso de carne de frango crua.

Procedimentos de enumeração do método USDA/FSIS podem ser realizados pela técnica de número mais provável (NMP) descrita como sensível, detectando 100 UFC/g ou menos de *L. monocytogenes*, ou por semeadura em superfície, que pode subestimar o número de células presentes, particularmente as injuriadas (COOK, 1999; DONNELLY, 2002). Porém, Carrol et al. (2000), compararam o método da técnica NMP com um método rápido, que consiste da combinação de um sistema de filtro monitorado e análise microbiológica (*Listeria*-SELeCT), para detecção e quantificação de *L. monocytogenes* em amostras de carne, e constataram que o método *Listeria*-SELeCT foi consideravelmente mais seguro para a determinação quantitativa do número de microrganismo viável em amostras de carnes.

Um dos maiores problemas na identificação de *Listeria* está na distinção de *L. monocytogenes* de outras espécies de *Listeria* não patogênicas, especialmente *Listeria innocua*, que pode não somente estar presente como também predominar

em alimentos (CARROL et al., 2000). Alguns estudos indicam que *L. innocua* multiplica-se mais rápido do que *L. monocytogenes*, principalmente em meio não seletivo, mascarando a presença do patógeno (FLANDERS; DONNELLY, 1994; CURIALE; LEWUS, 1994; BEUMER et al., 1996).

Cornu et al. (2002), ao determinarem o tempo de geração de 13 cepas de *L. innocua* e *L. monocytogenes* em caldo BHI e em diferentes meios de enriquecimento, não mostraram em seus resultados diferença significativa nas características de multiplicação entre as duas espécies, sugerindo que a vantagem de crescimento de *L. innocua* em meio de enriquecimento não foi tão significativa quanto previamente descrito. A análise cinética da mistura de cepas de *L. monocytogenes* e cepas de *L. innocua* demonstrou a possibilidade de interação inibitória entre essas duas espécies, resultando em um maior crescimento de *L. innocua* em caldo de enriquecimento.

Entretanto, Curiale e Lewus (1994) conduziram um estudo para avaliar a detecção de *L. monocytogenes* em carnes inoculadas com *L. innocua* e *L. monocytogenes*. O patógeno foi isolado em 5,4% das amostras de caldo de carne contendo 140 e 1.400 células de *L. monocytogenes* por 25 ml da amostra e na presença de duas vezes mais *L. innocua*, que foi isolada em todas as amostras. Entretanto, na ausência de *L. innocua*, o patógeno foi isolado em 100% das amostras. O tempo de geração foi determinado em caldo TSBYE a 35 °C, caldo UVM a 30 °C e caldo Fraser modificado a 35 °C. *L. innocua* apresentou taxa de crescimento mais rápida do que *L. monocytogenes* nos três caldos testados.

Métodos tradicionais de identificação e análises bioquímicas são capazes de identificar espécies de *Listeria* após o isolamento, num período de dois a cinco dias (CARROL et al., 2000). Por isso, vários testes para detecção rápida foram desenvolvidos para identificação de *Listeria* spp. e listados pelo FDA, entre eles os testes 20 S™, API 20 STREP, API ZYM, MICRO ID, API 50 CH e MAST ID, os quais identificam o patógeno somente em nível de gênero. Os testes bioquímicos MICRO ID *Listeria* e sistema API *Listeria* são mais sensíveis e identificam até o nível de espécies em 24 horas (DENVER et al., 1993).

O sistema API *Listeria* apresenta boa especificidade e é composto de diferentes testes, como teste de presença ou ausência de arilimidase (DIM), que diferencia *L. innocua* de *L. monocytogenes*, bem como testes de hidrólise de esculina, presença de  $\alpha$ -manosidase, produção de ácido D-arabitol, D-xilose, L-ramnose,  $\alpha$ -metil-D-glucosidase, D-ribose, glucose-1-fosfato e tagatose (BILLE et al., 1992).

McLauchin (1997) realizou um estudo comparativo de métodos para identificação entre as espécies de *Listeria*. Trezentas e cinquenta culturas das seis espécies de *Listeria* foram submetidas a testes convencionais de fermentação de açúcares e reações hemolíticas, hidrólise de DL-alanina  $\beta$ -naftilamida (DLABN) e teste comercial API *Listeria*. O autor relatou que, através de testes convencionais, 99% das culturas foram identificadas corretamente, com quatro culturas de *L. monocytogenes* identificadas como *L. innocua*. Quando utilizado teste de hidrólise DLABN, distinguiu-se *L. monocytogenes* em 98% das culturas; seis das 14 cepas de *L. ivanovii* mostraram resultados atípicos. Foi observada uma identificação correta para 97% das culturas com o uso do teste comercial API *Listeria*, não havendo nenhuma identificação incorreta entre as espécies. Entretanto, nove culturas apresentaram perfil equivocado para seis culturas de *L. monocytogenes* e três de *L. innocua*, não descrevendo essas culturas entre as espécies de *Listeria*.

Métodos para subtipagem de *Listeria* podem ser divididos em métodos convencionais, que incluem sorotipagem, bacteriocina-tipagem, fagotipagem, vários testes fisiológicos e bioquímicos, e métodos moleculares, como eletroforese de enzima multilocus (MEE), análise de enzimas de restrição do DNA (REA-DNA), análise do perfil de digestão de enzimas de restrição em eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE), amplificação aleatória do DNA polimórfico (RADP) por PCR, ribotipagem, entre outros (HOWARD et al., 1992; MARGOLLES et al., 1998).

As cepas de *L. monocytogenes* podem ser diferenciadas por meio de 14 sorotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4bX, 4c, 4d, 5, 6a, 6b) (DONELLY, 2001), designados com base na presença de antígenos somáticos e flagelares específicos (RYSER; DONELLY, 2001). Apesar da ampla ocorrência de *L.*

*monocytogenes* na natureza, somente os tipos 4b, 1/2a e 1/2b somam 96% dos casos de listeriose em humanos nos Estados Unidos (DONNELLY, 2001). O sorotipo 1/2 é comumente isolado em produtos cárneos, e os mais incidentes são, em ordem decrescente, 1/2a, 1/2b e 4b, enquanto as cepas freqüentemente isoladas de casos clínicos são 4b, 1/2a e 1/2b (JAY, 1996). Uma vez que todas as espécies não patogênicas de *Listeria*, exceto *L. welshimeri*, dividem um ou mais antígenos somáticos com *L. monocytogenes*, o uso de sorotipagem como teste individual, sem caracterização bioquímica, não se apresenta como adequado para a confirmação de cepas isoladas como *L. monocytogenes* (RYSER; DONNELLY, 2001).

Um variedade de métodos não convencionais que utilizam técnicas ELISA (enzyme-linked immunosorbant assays) tem sido desenvolvida e utilizada para rápida identificação de *Listeria* em relação ao gênero e espécie (VANDERLINDE; GRAU, 1991; SØLVE et al., 2000). Esses métodos têm acelerado consideravelmente a identificação de amostras positivas para *Listeria*, e entre os testes aprovados para identificação em relação ao gênero estão *Listeria*-Tek, Assurance *Listeria* e Tecra *Listeria* Visual Immunoassay. O teste VIP™ e o sistema automatizado VIDAS *Listeria* Assay são utilizados para detectar *L. monocytogenes* e espécies relacionadas (RYSER; DONNELLY, 2001).

Entre os vários testes não radioativos baseados em sonda de DNA e aplicados para identificação de gênero e espécies de *Listeria*, estão o Gene-Trak Colorimetric *Listeria* Assay, específico para identificação de gênero, o AccuProbe™, uma análise quimioluminescente gênero-específica, e sistemas de identificação baseados em DNA de culturas puras de *Listeria*, sistema automatizado de caracterização microbiana Riboprinter e método de amplificação baseado em PCR específico para identificação de *L. monocytogenes* em culturas submetidas ao enriquecimento (RYSER; DONNELLY, 2001).

Devido a *L. monocytogenes* apresentar-se amplamente distribuída na natureza, os métodos de tipagem são essenciais na pesquisa da fonte do alimento contaminado e para estudos epidemiológicos de listeriose (MARGOLLES et al., 1998). Os critérios gerais para metodologias de tipagem incluem fatores como

reprodutibilidade, tipificação, poder discriminatório, facilidade de interpretação e facilidade de uso (FABER, 1996). Métodos REA-DNA, PFGE e RADP têm sido os mais utilizados para a subtipagem de *Listeria*, devido à alta capacidade discriminatória da análise e facilidade de uso (RYSER; DONNELLY, 2001).

Eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) tem demonstrado ser uma importante ferramenta na caracterização de *L. monocytogenes* e tem exercido um importante papel em estabelecer relação epidemiológica e a localização das cepas dentro de um determinado meio (BROSH et al., 1994). Esse método detecta diferenças no peso molecular (perfil de migração) dos fragmentos do DNA gerados a partir da utilização de endonucleases de restrição (LAI et al., 1989; LUCHANSKY, 1994). Por ser um método com alto poder discriminatório e de alta reprodutibilidade, PFGE tem sido usado em diversos estudos para subtipagem de *L. monocytogenes* (BUCHRIESER et al., 1993; GIOVANNACCI et al., 1999; HOWARD et al., 1992; NAKAMA, 1998; POURSHABAN et al., 1999; PROCTOR et al.; 1995; SENCZEK et al., 2000).

## **2.10 Controle de *Listeria monocytogenes* em alimentos**

Os fatores utilizados no controle de *L. monocytogenes* dentro de um determinado alimento dependem de sua sobrevivência e multiplicação nesse produto específico. *L. monocytogenes* pode tolerar uma ampla faixa de pH, temperaturas, concentrações de sal e atividade de água que podem ser indesejáveis para diversas outras bactérias. Devido a essa característica, tentativas de controle do patógeno têm sido feitas visando prevenir a presença de *L. monocytogenes* nas plantas de processamento, de forma a evitar a contaminação do produto final (LOVETT, 1989).

Em alimentos prontos para consumo, a refrigeração muitas vezes atua como o principal meio de controle de microrganismos, sendo algumas vezes o único meio utilizado nesses tipos de produtos. Refrigeração ou vácuo podem não ser barreiras suficientes contra a multiplicação de patógenos em produtos cárneos (QVIST et al.,

1994). Em caso de temperatura abusiva durante o período de estocagem, alguns microrganismos patogênicos psicotróficos, como *L. monocytogenes*, podem multiplicar-se com pouca ou nenhuma mudança nas características sensoriais do produto (HAO et al., 1998). Sendo assim, a aplicação de barreiras físicas (p. ex., irradiação, ultra-alta pressão, calor), químicas (p. ex., ácidos orgânicos e sais, compostos fenólicos) ou biológicas (p. ex., bactérias lácticas, bacteriocinas, óleos essenciais de plantas) para o controle de *L. monocytogenes* deve ser considerada como sistema alternativo na conservação de produtos cárneos prontos para consumo (CUTTER, 2000; JUNCHER et al., 2000; KANG; FUNG, 1998; KIM et al., 1995; LEWUS et al., 1991; NIKU-PAAVOLA, 1999; QVIST et al., 1994; SAMELIS et al., 2002; SEMAN et al., 2002; SOFOS et al., 1998).

### **2.10.1 Controle de *Listeria monocytogenes* por ácidos orgânicos e seus sais**

Um dos fatores primários que afetam a multiplicação microbiana em alimentos é a acidez, que é medida em termos de pH, ou logarítmico negativo da concentração do íon de hidrogênio de uma solução. A maioria das bactérias prefere valores de pH próximos à neutralidade (7,0), mas os valores de pH que permitem a multiplicação e sobrevivência variam de > 2,0 a < de 9,0 (DOORES, 1993).

A adição de ácidos em alimentos, além da atividade antimicrobiana, pode ser usada como agente flavorizante, agente tamponante, seqüestrante e sinergista para antioxidantes e auxiliares de cura (FOEGENDING; BUSTA, 1991), e o comportamento de *L. monocytogenes* em meios contendo ácidos orgânicos como agentes antimicrobianos pode ser afetado tanto pelo pH quanto pela temperatura de incubação (HOUSTMA et al., 1996; NERBRINK et al., 1999; YOUNG; FOEGEDING, 1993).

A multiplicação e a inibição de *L. monocytogenes* podem variar na presença de diferentes ácidos. A maioria dos ácidos orgânicos permitidos em alimentos é aplicada como acidulante (p. ex., ácido láctico ou acético), enquanto outros,

particularmente na forma de sais, são usados como conservantes. A efetividade desses ácidos orgânicos fracos como agentes conservantes é relacionada à quantidade da forma não dissociada presente (LOU; YOUSEF, 1999).

Ácido láctico ou 2-hidroxiopropanóico ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ) ( $\text{pKa} = 3,83$ ) é formado durante o processo fermentativo pelas bactérias lácticas. Homofermentações e heterofermentações resultam em produtos como picles, queijo, azeitonas, iogurte e carnes fermentadas. O ácido láctico produzido em produtos fermentados através da degradação de açúcares por bactérias diminui o pH a valores desfavoráveis à multiplicação de bactérias deterioradoras ou patogênicas (SOFOS; BUSTA, 1992).

Ácido acético ou etanóico ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) é solúvel em água e tem valor de pKa de 4,75, resultando na oxidação do etanol pelas bactérias *Acetobacter* e *Gluconobacter*, sendo prevacente em vinagre. Nessa forma, o ácido acético constitui um dos mais antigos conservantes em uso (SOFOS et al., 1998). Os derivativos do ácido acético, como acetato de sódio e cálcio, diacetato de sódio e cálcio, e ácido de-hidroacético, também podem ser usados como agentes antimicrobianos. Esses compostos são reconhecidos como GRAS (Generally Regard As Safety) e podem ser aplicados de acordo com GMPs (Good Manufacture Pratices) (DOORES, 1993).

Vários outros ácidos orgânicos estão presentes como constituintes naturais em diferentes alimentos e alguns têm sido utilizados como aditivos intencionais, na função de conservantes, durante o processamento de alimentos, tais como o ácido sórbico, o caprílico, o cítrico, o fumárico, o málico e o succínico (SOFOS et al., 1998).

#### **2.10.1.1 Modo de ação de ácidos orgânicos e seus sais**

A atividade antimicrobiana de um aditivo depende do componente utilizado, do microrganismo e do alimento a ser conservado. O espectro antimicrobiano deve

ser o mais amplo possível, e a inibição do microrganismo não deve alterar as características físico-químicas e microbiológicas do alimento, assim como não deve favorecer a multiplicação de outros microrganismos potencialmente patogênicos, o que tornaria o alimento impróprio para consumo humano (SOFOS et al., 1998).

O mecanismo através do qual compostos antimicrobianos afetam o crescimento microbiano é complexo e de difícil elucidação (LOU; YOUSEF, 1999; RUSSEL, 1991). As razões para essa complexidade estão baseadas no potencial dos constituintes da célula ou da atividade celular afetada, e na complexidade e não-homogeneidade da matriz alimentar na qual os compostos serão utilizados (SOFOS et al., 1998). Ácidos inibem a multiplicação microbiana devido ao decréscimo do pH, ou através de moléculas não dissociadas ou ânions. Com o decréscimo do pH e a conseqüente aproximação da constante de dissociação (pKa) dos ácidos orgânicos de cadeia curta, a molécula não dissociada atravessa a membrana plasmática e entra na célula microbiana, onde se dissocia, acidificando o citoplasma pela diminuição do pH intracelular (BRUL; COOTE, 1999; PHAN-THAN et al., 2000; YOUNG; FOEDING, 1993; WIT; ROMBOUTS, 1990). Para a manutenção do pH citoplasmático, prótons gerados no citoplasma devem ser lançados para fora, e este ato interrompe a força motiva do próton, resultando na interferência da fosforilação oxidativa e no sistema de transporte de nutrientes da célula (SOFOS et al., 1998).

Entre a ação dos ácidos orgânicos e seus sais, incluem-se a inibição da síntese da parede celular, a atividade na membrana celular, a inibição da síntese protéica, a atividade dos ácidos nucléicos, a inibição enzimática e a interferência nas funções de transporte e mecanismo de absorção da célula (LOU; YOUSEF, 1999; SOFOS; BUSTA, 1992). A atividade também está relacionada ao tipo e ao grupo do microrganismo. Microrganismos gram-positivos e não formadores de esporos, geralmente, apresentam maior sensibilidade a compostos antimicrobianos, devido à ausência da membrana externa, composta de lipopolissacarídeos, proteínas e lipídios presentes nos microrganismos gram-negativos, que atuam como barreira na entrada de agentes químicos (RUSSEL, 1991).

### **2.10.1.2 Modo de ação de ácidos orgânicos e seus sais sobre *Listeria monocytogenes***

Várias pesquisas têm sido conduzidas em meios de cultura e produtos cárneos para avaliar a atividade antibacteriana de uma série de aditivos alimentares, incluindo ácidos orgânicos e seus sais (HOUSTMA et al., 1993; UNDA et al., 1991; QVIST et al., 1994; BLOM et al.; 1997; DEVLIEGHERE et al., 2000; FAITH et al., 1992; BEDIE et al.; 2002). Ácidos orgânicos apresentam maior atividade antimicrobiana, principalmente devido ao decréscimo do pH; entretanto, apesar dos sais de ácidos orgânicos serem menos eficazes na inibição de *L. monocytogenes*, estes compostos podem ser adicionados em maiores concentrações sem alterar a qualidade organoléptica do produto alimentar (BUNCIC et al., 1995).

*L. monocytogenes* apresenta melhor crescimento em produtos cárneos com pH próximo ou acima de 6,0 do que em produtos com pH próximo ou abaixo de 5,0 (BERRY et al., 1991). Em baixos valores-limites de pH, *Listeria* pode resistir dependendo da composição do meio, da cepa utilizada e de seu estado fisiológico. Phan-Thah et al. (2000), avaliando a resposta de *L. monocytogenes* a meios ácidos, verificaram que, quando o microrganismo foi exposto a valores abaixo dos valores limites de pH, ocorreu a morte do patógeno. *L. monocytogenes* foi adaptada em um pH intermediário não-letal (4,8 e 5,5, para cepas EGD e LO28, respectivamente), e os autores observaram que o microrganismo teve aumentada sua capacidade de resistência ao estresse ácido.

Vários pesquisadores têm relatado que em meios de cultura o ácido acético apresenta maior efeito antibacteriano do que o ácido láctico, o qual, por sua vez, é mais eficiente do que o ácido hidrocloreídrico (AHAMAD; MARTH, 1989; FARBER et al., 1989; ITA; HUTKINS, 1991; YOUNG; FOEGEDING, 1993).

Os efeitos do ácido acético, láctico ou cítrico na multiplicação e sobrevivência de *L. monocytogenes* CA e V7 em caldo triptose em diferentes temperaturas (7 a 35

°C) foram testados por Ahamad e Marth (1989). Os pesquisadores observaram uma interação da temperatura, tipos e concentrações dos ácidos e cepas utilizadas. A presença acima de 0,1% de ácido acético, láctico ou cítrico no meio inibiu a multiplicação do patógeno, e o grau de inibição aumentou à medida que ocorreu um decréscimo na temperatura de incubação. Não foi observada a multiplicação de *L. monocytogenes* na presença de 0,1% de ácido acético a 7 °C. O patógeno foi inativado em todas as temperaturas testadas quando a concentração do ácido no meio foi de 0,3% ou superior a esta concentração. O ácido acético foi o mais eficaz em relação aos ácidos láctico ou cítrico, fato atribuído pelos autores às constantes de dissociação.

Ita e Hutkins (1991) avaliaram os efeitos dos ácidos acético, láctico, cítrico e hidrocloreídrico na multiplicação, sobrevivência e nos valores de pH intracelular de *L. monocytogenes* Scott A em caldo soja tripticase adicionados de extrato de levedura com pH controlado. O patógeno multiplicou-se mesmo com pH reduzido a 3,5. Para a maioria dos ácidos, *L. monocytogenes* manteve um gradiente de pH (pH intracelular, pH externo) de aproximadamente uma unidade e um pH intracelular próximo a 5,0. Quando as células foram expostas ao ácido láctico, cítrico ou hidrocloreídrico a valores de pH de 3,5, 4,0 ou 4,5 e incubadas por 24 h, valores de pH intracelular e externo decresceram. Apesar de os ácidos láctico e cítrico terem sido mais eficazes na diminuição do pH intracelular, o ácido acético apresentou o maior efeito na sobrevivência do microrganismo. Os autores observaram uma redução maior do que quatro ciclos logarítmicos quando *L. monocytogenes* foi mantida em ácido acético por 24 h a pH 3,5, apesar de ter apresentado pH intracelular 5,0, enquanto para os outros compostos ocorreu somente o decréscimo de uma unidade ou menos. Os resultados do trabalho mostraram que a inibição do patógeno pelos ácidos testados pode estar relacionada a efeitos específicos de ácido não dissociado em atividades metabólicas ou fisiológicas, e não somente ao decréscimo do pH intracelular.

Resultados similares foram obtidos por Young e Foegeding (1993), que avaliaram os efeitos dos ácidos acético, láctico e cítrico e pH na multiplicação e nos

valores do pH intracelular de *L. monocytogenes* Scott A em meio BHI. Os resultados obtidos mostraram que a taxa de crescimento de *L. monocytogenes* Scott A diminuiu à medida que ocorreu um decréscimo nos valores do pH inicial e/ou um aumento na concentração da acidez total. Dos ácidos testados, o ácido acético foi o mais eficaz na inibição do patógeno quando comparados os valores iniciais de pH e base ácida equimolar, seguido pelos ácidos láctico e cítrico; entretanto, quando baseado nas concentrações iniciais de ácido não dissociado, o ácido cítrico foi o mais inibitório dos ácidos testados. O efeito da concentração total dos ácidos acético, láctico e cítrico na taxa de crescimento foi influenciado pelo pH intracelular e pelo ácido usado para ajustar o pH do meio. Os autores concluíram que o pH do meio, a concentração do ácido e o tipo de ácido utilizado afetaram a multiplicação de *L. monocytogenes* Scott A, indicando que existe um efeito específico do ácido na inibição.

Estudo conduzido por Farber et al. (1989b) avaliou os efeitos da adição dos ácidos láctico, acético e cítrico na multiplicação de quatro cepas de *L. monocytogenes* em caldo BHI, com valores de pH variando de 4,0 a 6,0. Resultados mostraram que o ácido acético foi o mais eficaz dos acidulantes testados sobre as cepas de *L. monocytogenes*, não sendo observada a multiplicação do patógeno em pH menores que 5,6 a 4 °C, ou menores que 5,0 a 30 °C. O valor mínimo de pH requerido para o patógeno iniciar a multiplicação variou de 5,0 a 5,7 a 4 °C, e de 4,3 a 5,2 a 30 °C, dependendo do acidulante utilizado.

Sorrels et al. (1989) testaram o efeito dos ácidos acético, láctico, málico, cítrico e clorídrico, do pH, da temperatura e do tempo de incubação na sobrevivência de *L. monocytogenes* em caldo soja tripticase. Em relação ao pH do meio, a ordem de efetividade observada foi ácido acético > láctico > cítrico ≥ málico > clorídrico. Quando baseado na concentração molar, a ordem da eficácia da atividade antimicrobiana foi ácido cítrico ≥ málico > láctico ≥ acético > clorídrico, a 35 e 25 °C, e ácido málico > cítrico > acético ≥ láctico > clorídrico, a 10 °C. O maior efeito antimicrobiano observado ocorreu a 35 °C; a melhor sobrevivência a 10 °C; e a melhor multiplicação, a 25 °C. Segundo os autores, a inibição do patógeno em meio ácido pode ter sido em função do ácido e da temperatura de incubação utilizados,

mostrando que existem diferenças aparentes na atividade antimicrobiana dos ácidos sobre *L. monocytogenes*.

Palumbo e Williams (1994) estudaram os efeitos da imersão de salsichas em soluções de ácidos orgânicos para controlar *L. monocytogenes*, que pode estar presente na superfície do produto, após o processamento térmico. O uso combinado de ácido acético e ácido cítrico (2,5% p/v de cada ácido) restringiu a multiplicação e o desenvolvimento do patógeno em salsichas embaladas a vácuo e estocadas a 5 °C por 90 dias. A adição isolada de 5% de ácido láctico, tartárico, cítrico ou acético também inibiu a multiplicação de *L. monocytogenes*.

Buchanan e Golden (1994) avaliaram os efeitos e interações entre pH (4,0 a 7,0) e ácido cítrico (0,1 a 2,0M) na inativação de *L. monocytogenes* em caldo BHI. Os pesquisadores verificaram que a inibição do patógeno foi dependente do pH e das concentrações de ácido cítrico. A valores de pH de 5,0 e 6,0, baixas concentrações de ácido cítrico apresentaram um efeito protetor. Em altas concentrações de ácido cítrico, foi observado um efeito inibitório atribuído ao ânion, sendo a inibição do patógeno correlacionada com a forma completamente não-dissociada do ácido. De acordo com os autores, os efeitos do ácido cítrico sobre *L. monocytogenes* depende da concentração do ácido utilizada e dos valores de pH.

Faith et al. (1992) monitoraram a multiplicação de *L. monocytogenes* em exudatos de salsichas ou em caldo triptose, ambas na presença de um líquido de defumação comercial (CharSol Supreme) ou ingredientes de defumação como ácido acético e compostos fenólicos. Os resultados indicaram que o patógeno foi inativado na presença de 0,2% e 0,6% de CharSol Supreme em exudato de salsicha mantido a 25 °C. Entretanto, dos 11 compostos fenólicos testados, somente isoeugenol apresentou atividade inibitória, e a multiplicação do patógeno na presença desse composto (100 ppm) foi maior em caldo triptose a 37 °C acidificado com ácido acético a pH 5,8 do que a pH 7,0.

Assim como outros ácidos lipofílicos, a atividade do ácido propiônico é maior quando os valores de pH aproximam-se de seu valor de pKa (FOEGEDING; BUSTA,

1991). De acordo com Ogden et al. (1995), a atividade antimicrobiana do ácido propiônico em carne de porco fatiada foi maior do que a observada para o ácido láctico. O efeito dos ácidos propiônico e ascórbico e suas combinações foi avaliado por Ogden et al. (1997). Os resultados obtidos revelaram que não ocorreu a multiplicação de *L. monocytogenes* em carne de porco durante oito dias de estocagem a 25 °C.

El-Shenawy e Marth (1992) estudaram o comportamento de *L. monocytogenes* a 13 ou 35 °C em caldo triptose contendo concentrações de 0,0% a 0,3% de propionato de sódio e valores de pH ajustados para 5,0 ou 5,6 com ácido acético, tartárico, cítrico ou láctico. O patógeno multiplicou-se lentamente no caldo a 13 °C, quando o pH foi ajustado para 5,0 com ácido acético ou tartárico. Também foi observada multiplicação a 13 ou 35 °C quando caldo triptose foi corrigido para pH 5,6, com ácido acético ou tartárico contendo 0,05% ou 0,15% de propionato de sódio; mas 0,3% de propionato de sódio inibiu a multiplicação do patógeno. Quando o pH do caldo foi ajustado para pH 5,0 com os mesmos ácidos, a multiplicação de *L. monocytogenes* foi inibida ou inativada pela adição de 0,15% ou 0,3% de propionato de sódio. A multiplicação do patógeno foi observada a 13 ou 35 °C em caldo triptose com pH 5,6 ajustado com ácido cítrico ou láctico contendo 0,05% ou 0,15% de propionato de sódio, apesar de a fase lag ter sido prolongada com o aumento da concentração de propionato. Sob essas condições, 0,3% de propionato ocasionalmente inibiu a multiplicação de *L. monocytogenes*. A multiplicação foi reduzida ou completamente inibida pela adição de 0,15% ou 3,0% de propionato de sódio em caldo triptose com pH ajustado para 5,0 com ácido cítrico ou láctico.

Produtos cárneos cozidos podem ser contaminados com *L. monocytogenes* nas etapas de empacotamento e/ou fatiamento, após o tratamento térmico (NERBRINK et al., 1999; DEVLIEGHERE et al., 2000). Nestes produtos prontos para consumo, que não necessitam de reaquecimento, a qualidade microbiológica pode ser assegurada pela adição de substâncias que atuam como barreiras à multiplicação do patógeno. A adição de sais de ácidos orgânicos, como lactatos e acetatos, tem sido descrita na literatura como agentes conservantes eficazes no

controle de *L. monocytogenes* em produtos cárneos (JUNCHER et al. 2000; NERBRINK et al., 1999; WEAVER; SHELEF, 1993; WEDERQUIST et al., 1995).

A atividade antimicrobiana de sais de ácido láctico sobre *L. monocytogenes* pode ser potencializada em combinação com cloreto de sódio, nitrito ou baixa temperatura de estocagem (CHEN; SHELEF; 1992; WEAVER; SHELEF, 1993). Em estudo conduzido por Buncic et al. (1995) foi verificada a atividade inibitória da adição de 4% de lactato de sódio, 0,3% de sorbato de potássio e nisina (400 IU/ml), na presença ou ausência de 125 ppm de sais de cura (nitrito) e de 0,5% de polifosfato sobre *L. monocytogenes* em caldo BHI tamponado durante incubação a 4 °C. Os resultados revelaram que, na ausência dos conservantes, o patógeno multiplicou-se diante de polifosfato, mas não de nitrito, ou combinação destes. Os autores observaram um efeito bacteriostático na presença de lactato de sódio, sorbato de potássio ou na de sais de cura. Porém, a adição de sorbato de potássio mostrou um diferenciado efeito bactericida na presença de sais de cura ou nitrito e polifosfato, reduzindo a população em 6,7 e 5,4 ciclos logarítmicos, respectivamente. Embora a nisina tenha apresentado resposta bactericida, a população inicial do patógeno foi restaurada em 14 dias. Entretanto, *L. monocytogenes* foi eliminada com a adição de nisina em combinação com lactato, nitrito ou nitrito e polifosfato.

Nerbrink et al. (1999) desenvolveram um modelo preditivo para observar o comportamento de *L. monocytogenes* na presença de nitrito, com diferentes valores de pH, cloreto de sódio, lactato e acetato de sódio em caldo BHI a 9 °C por 30 dias. Os resultados demonstraram que a multiplicação do patógeno foi influenciada significativamente pelos valores de pH, teores de cloreto de sódio, acetato ou lactato de sódio. Na Dinamarca, Juncher et al. (2000) estudaram os efeitos da adição de 2% de lactato e 0,5% de acetato ou 2% de lactato e 0,25% de glucona-delta-lactona combinados com 60 ou 150 ppm de nitrito na multiplicação de *L. monocytogenes* em *saveloys* fatiados e estocados a 5 e 10 °C por 28 dias. Os autores observaram que o microrganismo sobreviveu aos aditivos testados em *saveloys* formulados com 60 ou 150 ppm de nitrito e estocados a 5 e 10 °C por 28 dias, sem a multiplicação do patógeno.

O efeito do acetato de sódio ou propionato de sódio adicionados com EDTA e ácido ascórbico na inativação de uma mistura de três cepas *L. monocytogenes* em caldo BHI sob diferentes valores de pH e temperaturas foi avaliado por Golden et al. (1995). Os autores constataram que a taxa de inativação do patógeno estava diretamente relacionada à concentração da mistura do ácido e à temperatura de incubação, e inversamente relacionada aos valores de pH. O principal fator da taxa de inativação foi o pH seguido pela concentração da forma não dissociada do ácido orgânico (acético ou propiônico). Os resultados indicaram que combinações de ácidos orgânicos e EDTA apresentaram vantagens para a inativação de *L. monocytogenes* em alimentos acidificados e mantidos sob refrigeração, evitando as limitações organoléticas associadas com os níveis excessivos de simples ácidos orgânicos.

*L. monocytogenes* pode sobreviver ou multiplicar-se em salsichas ou exudatos durante o período de estocagem em temperatura de refrigeração ou abusiva, mas fatores como processamento térmico, defumação, sais de cura e ácidos orgânicos contribuem para a qualidade microbiológica e a extensão da vida de prateleira de salsichas embaladas a vácuo, uma vez que somente essas barreiras são insuficientes para evitar o risco microbiológico em alguns produtos cárneos (FAITH et al., 1992).

Em pesquisa desenvolvida por Bedie et al. (2001), foi avaliada a atividade antimicrobiana da adição de lactato de sódio (3% ou 6%), acetato de sódio (0,25% ou 0,5%) ou diacetato de sódio (0,25% ou 0,5%) na formulação de salsichas inoculadas superficialmente com *L. monocytogenes* ( $10^3$ - $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>) e estocadas por 120 dias a 4 °C. A adição de 6% de lactato de sódio e de 0,5% de diacetato de sódio apresentou efeito bacteriostático, ou mesmo bactericida, durante o período de estocagem. A adição de 3% de lactato de sódio impediu a multiplicação do patógeno por pelo menos 70 dias, enquanto em salsichas formuladas com 0,25% de diacetato de sódio e 0,5% e 0,25% de acetato de sódio a multiplicação de *L. monocytogenes* foi inibida por 20 a 50 dias. Os resultados mostraram que concentrações de acetato de sódio permitidas (0,25%) pelo USDA/FSIS, ou acima do permitido (0,5%), podem

controlar a multiplicação de *L. monocytogenes* por aproximadamente 30 dias, enquanto concentrações de lactato de sódio (3%) e diacetato de sódio (0,25%) permitidas pela mesma agência podem inibir o patógeno por 70 e por 35 a 50 dias, respectivamente. Concentrações superiores de lactato de sódio (6%) ou de diacetato de sódio (0,5%) às permitidas pelo USDA/FSIS podem inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* em salsichas após 120 dias de estocagem a 4 °C, quando contaminadas superficialmente durante o empacotamento.

*L. monocytogenes* também teve a multiplicação inibida pela adição de sais de ácidos orgânicos na formulação de salsichas em estudo conduzido por Samelis et al. (2002), que avaliaram o efeito combinatório desses sais no produto. Salsichas foram formuladas com a adição de 1,8% de lactato de sódio ou com a combinação de lactato de sódio com 0,25% de glucona-delta-lactona, acetato de sódio ou diacetato de sódio, e, em seguida, inoculadas com *L. monocytogenes* ( $10^3$ - $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>) em momento à retirada da pele e antes do empacotamento. Enquanto somente a adição de 1,8% de lactato de sódio permitiu a multiplicação do patógeno de 35 a 50 dias, o efeito combinatório do lactato de sódio com os outros compostos testados inibiu completamente a multiplicação de *L. monocytogenes* por 120 dias a 4 °C. Em salsichas formuladas sem a adição dos compostos antimicrobianos durante estocagem prolongada a 4 °C, a população do patógeno aumentou oito ciclos logarítmicos após o período de estocagem a 4 °C.

Shelef e Yang (1991) estudaram os efeitos de lactato de sódio ou potássio sobre *L. monocytogenes* em meio de cultura e em carne bovina moída e de frango. Em meio de cultura, concentrações maiores do que 5% retardaram a multiplicação de três cepas de *L. monocytogenes*, enquanto em carne moída e carne de frango o patógeno foi inibido na presença de 4% de lactato de sódio ou potássio a 35, 20 e 5 °C. Combinações de 4% de lactato de sódio ou potássio com 3% de cloreto de sódio ou 140 ppm de nitrito não potencializaram o efeito inibitório. Os autores constataram que o íon lactato não foi o responsável pelo retardo na multiplicação do patógeno, uma vez que não ocorreu diferença no efeito inibitório entre os sais.

Seman et al. (2002), através de metodologia de superfície de resposta, estimaram a multiplicação de *L. monocytogenes* em produtos cárneos curados prontos para consumo, testando variáveis como cloreto de sódio (0,8% a 3,6%), diacetato de sódio (0,0% a 2,0%), xarope de lactato de potássio (0,25% a 9,25%) e teor de umidade (45,5% a 83,5%). O aumento nas concentrações de diacetato de sódio ( $P < 0,11$ ) e de lactato de potássio ( $P < 0,001$ ) resultou em reduções significativas nas constantes da taxa de crescimento de *L. monocytogenes*, enquanto um acréscimo na umidade final do produto ( $P < 0,11$ ) aumentou significativamente as constantes da taxa de crescimento do patógeno.

Weaver e Shelef (1993) testaram a atividade antimicrobiana de 2%, 3% ou 4% de lactato de sódio, potássio ou cálcio em salame de fígado de porco inoculado com 4,0-5,0  $\log_{10}$  UFC/g de *L. monocytogenes* Scott A durante estocagem a 5 ou 20 °C. Os resultados mostraram um maior efeito inibitório com o aumento da concentração dos sais nas temperaturas testadas. Em amostras contendo 3% dos sais de ácido láctico, houve um atraso na inibição do patógeno durante estocagem a 5 °C na presença do sal de sódio, um efeito bacteriostático na presença do sal de potássio e um leve efeito bactericida diante do sal de cálcio. Os mesmos efeitos foram observados a 20 °C, numa concentração dos sais de 4%. Combinações de lactatos com cloreto de sódio tiveram maior efeito antimicrobiano. Lactato de cálcio foi o mais eficaz dos três sais testados, sendo necessários somente 2% para inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* em salame de fígado de porco durante estocagem a 5 °C por 50 dias. Segundo os autores, as diferenças de inibição entre os sais de lactato podem ter decorrido do decréscimo do pH do produto, uma vez que sais de sódio e potássio (3%) não afetaram o pH do salame (~6,0), e o lactato de cálcio reduziu o pH do produto para 5,5.

Em pesquisa desenvolvida por Mbandi e Shelef (2001), foi avaliado o efeito isolado e combinado de lactato de sódio (1,8% e 2,5%), diacetato de sódio (0,1% e 0,2%) ou acetato de sódio (0,2%), na eliminação de *L. monocytogenes* em carne moída, durante estocagem a 5 e 10 °C. A adição de 1,8% de lactato de sódio diminuiu a taxa de crescimento de *L. monocytogenes*, e 0,2% de diacetato de sódio

foi mais eficaz do que lactato de sódio no controle do patógeno durante estocagem a 10 °C por 25 dias, enquanto um efeito sinergista foi observado na combinação de lactato de sódio e diacetato de sódio. A 5 °C, a combinação de 1,8% de lactato de sódio e 0,1% diacetato de sódio produziu um efeito bacteriostático sobre *L. monocytogenes*. Apesar de o acetato de sódio ter apresentado um efeito inibitório menor do que o diacetato de sódio, quando misturado com lactato de sódio, foi observada uma atividade sinergista sobre o patógeno.

O efeito isolado e combinado de lactato de sódio (2,5%) e diacetato de sódio (0,2%) em *beef bologna* foi estudado por Mbandi e Shelef (2002), sendo observado que a taxa de crescimento de uma mistura de seis cepas de *Listeria* foi mais rápida do que a de uma cepa única (Scott A) na ausência dos referidos sais. Enquanto o efeito isolado dos sais retardou a multiplicação de *Listeriae* a 5 °C durante 60 dias, o efeito da combinação desses compostos foi bactericida quando o produto foi inoculado com somente uma cepa e foi listeriestático para a mistura das seis cepas. De acordo com Stekelenburg e Kant-Muermans (2001), a adição de lactato de sódio (2,5% a 3,3%) ou diacetato de sódio (0,2%) também inibiu a multiplicação de *L. monocytogenes* em presunto cozido, mas a adição de diacetato de sódio afetou negativamente o odor e o gosto do produto.

Schlyter et al. (1993a) avaliaram a atividade de diacetato de sódio e ALTA<sup>®</sup>2341, produto utilizado para estender a vida de prateleira de produtos cárneos, em emulsão de carne de peru inoculadas com *L. monocytogenes* e estocadas a 25 °C. A adição de 0,3% de diacetato de sódio prolongou o tempo de geração para 7 h quando comparado com o tratamento-controle (ausência de aditivos; 1,7 h), enquanto a adição de 0,5% reduziu levemente a população do patógeno após sete dias. A combinação de ALTA<sup>®</sup> (0,25%; 0,5% ou 0,75%) com 0,3% de diacetato de sódio prolongou a fase lag de *L. monocytogenes* quando comparado com somente a adição de 0,3% de diacetato de sódio. Entretanto, a adição de 0,5% de diacetato de sódio com as três concentrações de ALTA<sup>®</sup> testadas tiveram um efeito bactericida após sete dias de estocagem a 25 °C.

Qvist et al. (1994) observaram a inibição de *L. monocytogenes* em diferentes formulações de salsicha do tipo *bologna* adicionadas de 2% de lactato de sódio e 0,25% glucona-delta-lactona ou de 2% de lactato de sódio e de 0,5% glucona-delta-lactona. O patógeno foi inoculado no produto fatiado, embalado a vácuo e estocado a 5 e 10 °C por 35 dias. Uma rápida multiplicação do patógeno foi observada nas amostras-controle, sem adição de aditivos, e naquelas formuladas com adição de 2% de lactato de sódio, quando o produto foi estocado a 5 e 10 °C, respectivamente. *L. monocytogenes* multiplicou-se em salsichas contendo 0,25% ou 0,5% de glucona-delta-lactona em 35 dias em ambas as temperaturas. Em amostras com 2% de lactato de sódio e sem adição de glucona-delta-lactona, a multiplicação foi inibida por 28 dias a 5 °C. Os resultados da pesquisa mostraram que foi possível inibir *L. monocytogenes* em produtos cárneos cozidos pela adição de lactato de sódio combinada com redução de pH por glucona-delta-lactona.

Schlyter et al. (1993b) avaliaram os efeitos de diacetato de sódio (0,1%, 0,3% e 0,5%) adicionado individualmente ou em combinação com nitrito de sódio (30 ppm), lactato de sódio (2,5%) ou pediocina (5.000 unidades arbitrárias/ml) em emulsão de carne de peru (25% de carne estéril em água deionizada) sobre *L. monocytogenes*. A adição de 0,3% ou 0,5% de diacetato de sódio teve efeito bactericida em amostras estocadas a 4 e 25 °C, após 28 e 7 dias, respectivamente. Na presença de nitrito não houve diferença significativa na multiplicação do patógeno se comparado com a adição de diacetato de sódio. A atividade antimicrobiana foi potencializada nos tratamentos com lactato de sódio e 0,3% de diacetato de sódio a 25 °C, e em tratamentos contendo lactato de sódio e 0,1% de diacetato de sódio a 4 °C, quando comparado aos tratamentos similares contendo somente lactato de sódio ou diacetato de sódio. Nos tratamentos com pediocina e 0,5% de diacetato de sódio a 25 °C e naqueles adicionados de pediocina e 0,3% de diacetato de sódio a 4 °C, foi observado um efeito bactericida. Os autores concluíram que a adição de diacetato de sódio pode inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* em carne de peru, porém a adição de diacetato de sódio combinado com lactato de sódio ou pediocina pode consistir uma barreira adicional à multiplicação do patógeno Harmayani et al. (1993) determinaram os efeitos de 1,8%

lactato de sódio, de 1% de kappa-carragena, de 0,1% de eritorbato de sódio ou a combinação de 0,4% de alginato de sódio, 0,6% de ácido láctico e 0,075% de carbonato de cálcio sobre *L. monocytogenes* em carne moída crua estocada a 4 °C por 15 dias. Não houve um aumento significativo ( $P > 0,05$ ) nos números do patógeno durante o período de estocagem, mas a população de *L. monocytogenes* foi menor nos tratamentos com lactato de sódio e maior para aqueles contendo eritorbato de sódio, se comparados com os tratamentos-controle e os tratamentos contendo os outros aditivos.

A eficiência de benzoato de sódio, propionato de sódio, sorbato de potássio e diacetato de sódio na sobrevivência de *L. monocytogenes* em salsichas de carne de peru foi estudada por Islam et al. (2002). Salsichas foram imersas por um minuto em solução com cada um dos compostos químicos em três diferentes concentrações (15%, 20%, e 25% p/v), com aproximadamente 0,3% do composto estando presente na superfície do produto. Para todos os compostos, nas três concentrações utilizadas, a população inicial de *L. monocytogenes* diminuiu significativamente ( $P < 0,05$ ) para 1 a 2  $\log_{10}$  UFC/g em relação ao tratamento-controle (água deionizada). Após 14 dias de estocagem a 4 °C, a população do patógeno para todos os tratamentos foi 3 a 4  $\log_{10}$  UFC/g menor do que para o tratamento-controle. Durante o mesmo período a 13 °C, a população do patógeno para salsichas tratadas com 25% de benzoato de sódio ou diacetato de sódio foi 3,5 a 4,5  $\log_{10}$  UFC/g menor do que para o tratamento-controle, enquanto para salsichas tratadas com 25% de propionato de sódio ou sorbato de potássio a população do patógeno foi 2,5  $\log_{10}$  UFC/g menor do que para o tratamento-controle. Para todas as condições, a inibição de *L. monocytogenes* foi diretamente proporcional à concentração do conservante testado. A inibição do patógeno a 22 °C por sete dias ou mais foi observada somente na presença de 25% de benzoato de sódio ou diacetato de sódio.

Wederquist et al. (1994) avaliaram os efeitos de 2% de lactato de sódio, 0,5% de acetato de sódio, 0,26% de sorbato de potássio e 1,0% de bicarbonato de sódio e combinações no controle de *L. monocytogenes* inoculada (2,54  $\log_{10}$  UFC/g) superficialmente após processamento em salsichas de carne de peru do tipo

*bologna* estocada a 4 °C. Os resultados mostrados revelaram que acetato de sódio apresentou-se como o mais eficaz sobre a multiplicação do patógeno na formulação do produto após 70 dias, seguido de 2% de lactato de sódio (91 dias) e 0,26% de sorbato de potássio (98 dias), enquanto a adição de 1,0% de bicarbonato de sódio permitiu um aumento de 6,78 log<sub>10</sub> UFC/g, o que não diferiu significativamente (P > 0,05) do tratamento-controle (6,43 log<sub>10</sub> UFC/g) após 63 dias. De acordo com os autores, a multiplicação de *L. monocytogenes* em *bologna* ou salsichas de peru pode ser significativamente reduzida com a incorporação desses compostos na sua formulação antes do final da vida de prateleira (75 dias).

Sais do ácido láctico, além de possuírem a atividade específica do ânion lactato como agente antimicrobiano, podem atuar como agentes umectantes, diminuindo a atividade de água ( $A_w$ ) em emulsão de produtos cárneos, inibindo ou retardando a multiplicação microbiana em produtos cárneos cozidos, sem afetar o pH do produto (SHELEF, 1994; BEDIE et al., 1999).

A relação de atividade de água ( $A_w$ ), lactato de potássio, cálcio ou sódio e teor de umidade (25% a 85%) sobre a multiplicação de *L. monocytogenes*, em um modelo experimental com carne bovina, foi estudada por Chen e Shelef (1992). A adição de 4% de lactato diminuiu a  $A_w$  da carne para cada teor de umidade. As diferenças entre os valores de  $A_w$  nas amostras controles e naquelas contendo lactato, para cada teor de umidade testada, aumentaram com o decréscimo na umidade, de 0,003 (85% de umidade) a 0,046 (25% de umidade) unidades. A adição de lactato de sódio (4%) inibiu a multiplicação do patógeno em amostras com teor de umidade maior do que 55% e inibiu a multiplicação em amostras com teor de umidade entre 25% a 55% ( $A_w < 0,964$ ). Concentrações de lactato menores que 4% não foram bacteriostáticas, mas combinações de 2% e 3% de lactatos com 2% de cloreto de sódio em amostras com 55% inibiram a multiplicação de *L. monocytogenes*. Lactato de potássio e cálcio foram tão eficazes na inibição da bactéria e na diminuição da  $A_w$  quanto o lactato de sódio.

### 2.10.3 Tratamento térmico no controle de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos

Processos térmicos visando à destruição de microrganismos patogênicos é uma das principais técnicas usadas na segurança do consumo de alimentos (DOYLE et al., 2001). A termorresistência de uma bactéria é descrita pelos valores D e z, sendo o valor D o tempo necessário, a uma dada temperatura, para destruir 90% das células viáveis ou esporos de um microrganismo específico; e o valor z, a mudança na temperatura de aquecimento necessária para mudar o valor D em um ciclo logarítmico (JUNEJA, 2002).

*L. monocytogenes* é um dos microrganismos patogênicos não formadores de esporo mais termotolerantes (MACKEY et al., 1990), e vários estudos têm sido conduzidos para avaliar sua resistência térmica em produtos cárneos (BOYLE et al., 1990; MAZZOTA; GOMBAS, 2001; MURIANA et al., 2002; PALUMBO et al., 1993; ROERING et al., 1998; SCHOENI et al., 1991; TAORMINA; BEUCHAT, 2002). A variabilidade da resistência térmica do patógeno, observada em diferentes pesquisas, pode estar associada a fatores como variação das cepas, condições prévias de crescimento, presença de aditivos na formulação, choques térmicos e ácidos e outros estresses, e composição do meio de isolamento e condições de incubação utilizadas (DOYLE et al., 2001; JUNEJA, 2002).

Roering et al. (1998) testaram o efeito da pasteurização pós-processamento em lingüiça do tipo *summer*. Embalagens contendo pedaços do produto foram inoculadas com aproximadamente  $10^8$  UFC/ml de uma mistura de três cepas de *L. monocytogenes* e fechadas a vácuo. Para pasteurização, essas embalagens foram submergidas de 0 a 240 segundos em banho de água, e a destruição do patógeno foi monitorada após pasteurização a 66, 77, 88 e 99 °C. A população de *L. monocytogenes* foi reduzida aproximadamente  $3 \log_{10}$  UFC por grama em 30, 60 ou 90 segundos a 99, 88 e 77 °C, respectivamente, ocorrendo redução menor de  $2 \log_{10}$  UFC por grama após 240 segundos de aquecimento a 66 °C. Os valores D obtidos a 66, 77, 88 e 99 °C foram de 2,08, 0,84, 0,37 e 0,28 minutos,

respectivamente. Segundo os autores, os resultados mostraram a aplicabilidade do uso de pasteurização no controle de *L. monocytogenes* em lingüiça do tipo *summer* embalada a vácuo.

Muriana et al. (2002) observaram os efeitos da pasteurização pós-processamento como uma alternativa na redução da contaminação superficial de *L. monocytogenes* em carne de peru defumada, *roast beef* e presunto defumado. Nos produtos inoculados com o patógeno, foi alcançada uma redução de dois a quatro ciclos logarítmicos quando aquecidos a 90,6, 93,3 e 96,1 °C por 2 a 10 minutos. Em carne de peru foram obtidos valores D de 416,7, 73,5, 25,4 e 9,3 segundos a 62,8, 65,6, 68,3 e 71,1 °C, respectivamente. Para *roast beef* e presunto defumado os valores D foram de 95,2, 54,1, 12,5 e 4,0 segundos e de 67,6, 29,6, 15,4 e 5,5 segundos, respectivamente. Valores z de 5,1, 5,7 e 7,9 °C foram obtidos para carne de peru defumada, *roast beef* e presunto defumado, respectivamente. De acordo com os autores, uma aquecimento de 2 minutos entre 90,6 a 96,1 °C pode reduzir em dois ciclos logarítmicos a população de *L. monocytogenes* nos produtos cárneos prontos para consumo testados, sugerindo que a pós-pasteurização pode ser uma intervenção eficaz no controle do patógeno em produtos cárneos de *delicatessen*.

Huang et al. (1992) avaliaram a termorresistência de *L. monocytogenes* Scott A e V7 em caldo de frango e as mudanças na resistência térmica do patógeno durante estocagem à temperatura de refrigeração. Após o preparo, o caldo de carne de frango foi resfriado a 40 °C e inoculado com  $10^5$  UFC/ml com *L. monocytogenes* e estocado a 7 °C por 10 dias. O caldo foi aquecido entre 50 e 65 °C, imediatamente após a inoculação, e decorridos 1, 3, 5 e 10 dias de estocagem. Os valores D para as cepas Scott A e V7 no caldo a 50 °C no dia 0 foram de 119 e 195 minutos e, no dia 10, de 115 e 199 minutos, respectivamente, enquanto a 65 °C, imediatamente após a inoculação, foram de 0,48 e 0,19 minutos e, no dia 10, de 0,014 e 0,007 minutos. Os valores z variaram de 6,10 a 3,87 °C e de 5,18 a 3,41 °C para as cepas Scott A e V7, respectivamente. Os autores constataram que a cepa V7 foi mais resistente do que a cepa Scott A a 50 °C, e que a cepa Scott A apresentou valores z

significativamente ( $P < 0,001$ ) maiores do que a cepa V7 no mesmo período de estocagem.

A inativação térmica de microrganismos na estrutura interna da carne pode diferir significativamente de meios líquidos e de superfícies externas (MURPHY et al., 1999). Murphy et al. (2000) avaliaram a inativação térmica de *L. innocua* M1 em carne de peito de frango moída e em meio microbiológico e compararam a cinética de inativação térmica do patógeno nos diferentes meios testados. Os valores D a temperaturas de 55, 62,5 °C e 70 °C foram de 50,8, 2,42 e 0,187 minutos e de 20,3, 0,783 e 0,103 minutos para carne de frango moída e água peptonada a 0,1% adicionada de agar a 0,1%, respectivamente. Os valores D obtidos para carne de frango foram significativamente maiores ( $P < 0,0001$ ) do que os obtidos em solução de água peptonada, entretanto os valores z não diferiram significativamente.

Boyle et al. (1990) avaliaram a inativação térmica de *L. monocytogenes* em solução tampão fosfato, emulsão de carne bovina e em carne bovina moída, sendo obtidos valores D a 60, 65 e 70 °C em tampão fosfato e emulsão de carne bovina de 0,63, 0,29 e 0,15, e de 2,54, 0,75 e 0,23 minutos, respectivamente. Quando a carne bovina moída foi aquecida à temperatura interna de 50, 60 e 65 °C ocorreu uma redução de 0,2 a 0,9, 1,6 a 3,4 e 4,4 a 6,1 ciclos logarítmicos da população de *L. monocytogenes* a partir de um inóculo inicial de 8,08  $\log_{10}$  UFC/g, respectivamente. De acordo com os autores, a destruição térmica de *L. monocytogenes*, para as três temperaturas testadas, foi mais rápida na solução tampão fosfato do que na emulsão de carne bovina.

Dados sobre a inativação térmica de uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes* em carne moída e salame do tipo *beaker* foram mostrados por Schoeni et al. (1991). Os autores obtiveram valores D a 54,4, 57,2, 60,0 e 62,8 °C de 22,4, 15,7, 4,47 e 2,56 minutos, respectivamente, para carne bovina moída, enquanto para salame do tipo *beaker* os valores D foram de 98,6, 44,4, 20,1, 11,2 e 9,13 minutos a temperaturas de 48,9, 51,7, 54,4, 57,2 e 60,0 °C, respectivamente.

Fain et al. (1991) determinaram valores D e z para *L. monocytogenes* Scott A em carnes bovinas moídas com alto (30,5%) e baixo (2,0%) teor de gordura, obtendo valores D a 57,2 °C (135 °F) de 2,6 e 5,8 minutos para carnes com alto e baixo teor de gordura, respectivamente. À temperatura de 62,7 °C (145 °F), os valores D foram de 0,6 (alto teor de gordura) e 1,2 (baixo teor de gordura) minutos para carne quando o patógeno foi recuperado em ágar CBN. Valores D obtidos a partir da recuperação de *L. monocytogenes* em ágar LPM, foram de 56,1 e 34,5 minutos a 51,7 °C (125 °F); de 2,4 e 4,6 minutos a 57,2 °C (135 °F); de 0,5 e 1,1 minuto a 62,7 °C (145 °F) para carnes com alto e baixo teor de gordura, respectivamente. Os valores z determinados foram de 9,3 e 11,4 °F quando usado ágar CBN e de 9,2 e 13,2 °F quando usado ágar LPM, para carnes com alto e baixo teor de gordura, respectivamente. Os autores observaram que o uso de ágar CBN foi mais eficiente do que o uso de ágar LPM na recuperação de *L. monocytogenes* Scott A em carnes bovinas moídas com alto e baixo teor de gordura, para todas as temperaturas testadas.

Yen et al. (1991) conduziram estudo para determinar o efeito de sais de cura na inativação térmica de uma mistura de nove cepas de *L. monocytogenes* em carne suína moída (15% de gordura). Diferentes concentrações de sais de cura foram adicionadas à carne, que foi posteriormente cozida em banho de água a uma temperatura interna de 60 °C. A eliminação de *L. monocytogenes* foi 3 log<sub>10</sub> UFC/grama maior (P < 0,005) em carne adicionada de 3% de cloreto de sódio do que em carne sem a adição do conservante. O efeito protetor do cloreto de sódio foi diretamente proporcional à concentração do aditivo (0,0%-3,0%) na inativação térmica do patógeno. A adição de 1% de dextrose e 0,4% de uma mistura de fosfatos atuou como termoprotetor de *L. monocytogenes* (P < 0,005). Já a adição de 0,0156% de nitrito de sódio e 0,055% de eritorbato de sódio não afetou (P > 0,005) a termorresistência do patógeno em carne suína moída. Maior efeito inibitório (P < 0,005) foi observado quando os aditivos foram combinados e adicionados na carne suína moída do que quando adicionados separadamente. De acordo com os autores, os resultados indicaram que existe um potencial mais elevado para a sobrevivência de *L. monocytogenes* durante o processamento térmico de produtos

cárneos curados, especialmente aqueles com alta concentração de sal e adicionados de sais de cura, do que em carnes não processadas.

Yen et al. (1992) avaliaram a inativação térmica de uma mistura de quatro cepas de *L. monocytogenes* em carne suína moída curada ou não curada (15% de gordura) formulada com 1% de  $\kappa$ -carragena ou 3% de lactato de sódio. Aditivos de cura consistiram em 2,5% de cloreto de sódio, 1% de dextrose, 0,4% de fosfato de sódio, 0,0156% de nitrito de sódio e 0,055% de eritorbato de sódio. Porções de carne de cada tratamento foram aquecidas à temperatura interna de 62 °C. Os resultados do trabalho indicaram que a destruição térmica do patógeno foi similar entre os tratamentos com diferentes aditivos, e que  $\kappa$ -carragena e lactato de sódio não apresentaram efeito significativo ( $P > 0,05$ ), quando comparados com carne suína não curada. Porém, a adição de  $\kappa$ -carragena reduziu ( $P < 0,05$ ) o efeito protetor exercido. Kappa-carragena reduziu significativamente ( $P < 0,05$ ) o efeito protetor exercido pelos sais de cura. O cozimento da carne suína a 62 °C durante 25 minutos de aquecimento (a partir de 45 °C) e com 13 minutos de resfriamento (até 45 °C) reduziu os números do patógeno em 5,80 a 7,35  $\log_{10}$  UFC/g, dependendo da formulação testada.

Lihono et al. (2001) avaliaram a influência da adição de 0,25% e 0,5% de pirofosfato de sódio (SPP) na inativação térmica de *L. monocytogenes* em emulsão de carne suína (carne triturada com água) e carne suína moída. Os valores D obtidos para emulsão e carne moída no tratamento-controle (0,0% SPP) a 55, 57,5, 60 e 62,5 °C foram de 8,15, 2,57, 0,99 e 0,18 minutos e de 15,72, 5,01, 1,60 e 0,83 minutos, respectivamente. Com a adição de 0,25% de SSP, os valores D obtidos para emulsão e carne moída foram de 4,75, 1,72, 0,40 minutos à temperatura de 55, 57,5, 60 °C, e de 16,9, 5,28, 1,56 e 0,80 minutos a 55, 57,5, 60 e 62,5 °C, respectivamente. A 62,5 °C, o patógeno foi eliminado rapidamente na emulsão e não foi possível determinar o valor D para esta temperatura. A adição de 0,5% de SPP diminuiu significativamente ( $P < 0,05$ ) a resistência térmica de *L. monocytogenes* em emulsão de carne suína, mas não na carne suína moída. Os valores z obtidos para a emulsão variaram de 4,63 a 5,47 °C, enquanto os valores z para carne moída foram

de 5,25 a 5,77 °C. Os autores concluíram que os valores D e z indicaram efeitos contrastantes da adição de SPP na inativação térmica de *L. monocytogenes* em emulsão de carne suína, se comparado com carne suína moída.

A resistência térmica de *L. monocytogenes* em carne suína moída, com ou sem adição de soja, foi avaliada por Ollinger-Snyder et al. (1995). O substrato foi inoculado com aproximadamente  $10^7$  UFC/grama em tubos, imersos em banho de água e mantidos sob temperatura de 50 a 62 °C por períodos preestabelecidos. Os valores D obtidos a 50, 55 e 60 °C foram de 108,81, 9,80 e 1,14 minutos para carne moída e de 11,64, 10,19 e 1,70 minutos para carne moída adicionada de soja, respectivamente. A 62 °C, o patógeno foi inativado rapidamente, não sendo determinado o valor D a esta temperatura. Quando a emulsão água/soja foi aquecida a 50 e 55 °C, os valores D foram de 19,84 e 3,94 minutos, respectivamente, e a 60 °C *L. monocytogenes* foi inativada rapidamente. Os valores z para *L. monocytogenes* em carne suína moída e carne suína moída adicionada de soja foram de 5,45 e 5,05 °C, respectivamente. De acordo com os autores, a contaminação natural com *L. monocytogenes* na carne suína e de  $10^2$  UFC/grama, logo os resultados indicaram que a carne suína moída e a carne suína moída adicionada de soja devem ser aquecidas a uma temperatura interna de 60 °C por pelo menos 4,6 e 6,8 minutos para alcançar uma redução na população do patógeno de quatro ciclos logarítmicos, respectivamente.

Estudo comparativo para avaliar a resistência térmica de uma cepa padrão E de *L. monocytogenes*, envolvida num surto de listeriose pelo consumo de salsichas com uma mistura de cepas de *L. monocytogenes* em emulsão de salsichas e caldo soja tripticase foi realizado por Mazzota e Gombas (2001). Valores D obtidos para a cepa padrão E no caldo e na emulsão foram significativamente menores ( $P < 0,05$ ) do que os valores D obtidos para a mistura de cepas. Os valores D à temperatura de 58 a 66 °C variaram de 14,4 a 0,65 e de 11 a 0,40 minutos, para cepa padrão E e mistura de cepas de *L. monocytogenes*, respectivamente. Os resultados obtidos mostraram que a cepa padrão E, envolvida num surto de listeriose pelo consumo de salsichas, não apresentou resistência térmica diferenciada em relação a mistura de

cepas do patógeno testada, em meio microbiológico ou emulsão de salsichas. De acordo com os autores, o cozimento da emulsão para formulação usada nesse estudo, por 30 segundos, a 71,1 °C, seria suficiente para inativar cinco ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes*.

Zaika et al. (1990) estudaram a inativação térmica de *L. monocytogenes* durante o processamento de salsichas. A emulsão foi inoculada com aproximadamente  $10^8$  UFC/grama com *L. monocytogenes* Scott A, e o produto foi aquecido até atingir uma temperatura interna de 68,3 a 73,8 °C (155 a 165 °F). Os resultados mostraram que o processo de produção de salsichas, 70 minutos a temperatura externa de 71,1 °C (160 °F), eliminaria a população do patógeno geralmente presente em carnes cruas (aproximadamente  $\leq 10^3$  UFC/grama),

Bhaduri et al. (1991) verificaram a inativação térmica de *L. monocytogenes* Scott A em emulsão de lingüiça de fígado (50% água; 50% carne). A emulsão foi aquecida a 57,2 a 62,8 °C. Quando o patógeno foi cultivado a 37 °C, foram obtidos valores D à temperatura de 57,2, 60 e 62,8 °C de 6,57, 1,57 e 0,43 minutos, respectivamente. Quando *L. monocytogenes* Scott A foi cultivada a 19 °C, houve um decréscimo na resistência térmica ( $D_{60^\circ\text{C}} = 0,8$  min). Os resultados mostraram que, para a inativação térmica de *L. monocytogenes* Scott A, o produto deve ser aquecido de 1 a 2 minutos a 65,6 °C, para assegurar a completa eliminação do patógeno.

A inativação térmica de *L. monocytogenes* Scott A durante o processamento de lingüiça de fígado foi estudada por Palumbo et al. (1993). A população do patógeno permaneceu inalterada quando o produto foi aquecido a 60 °C (140 °F), entretanto, quando aquecido a 65,6 °C (140 °F), foi observado um decréscimo marcante no número de células viáveis do patógeno. Quando o produto foi aquecido a 68,3 °C (155 °F), nenhuma célula viável de *L. monocytogenes* foi detectada.

O efeito do aquecimento rápido ( $> 10$  °C/min) e lento (0,3 e 0,6 °C min) na inativação térmica de *L. monocytogenes* em *sous vide beef* processados a 56, 60 e 64 °C foi determinado por Hansen e Knøchel (1996). Não foi observada diferença significativa ( $P = 0,07$ ) entre as temperaturas de aquecimento testadas. Quando

submetidos a aquecimento rápido, foram obtidos valores D a temperaturas de 56, 60 e 64 °C, de 26,8, 6,7 e 1,4 minutos, respectivamente. Quando submetidos a aquecimento lento de 0,3 ou 0,6 °C, valores D foram de 27,5, 6,4 e 1,6 minutos e 29,6, 7,1 e 1,7 minutos, respectivamente, à temperatura de 56, 60 e 64 °C. Os autores não observaram diferenças entre o aquecimento lento ( $\leq 0,6$  °C/min) e rápido no produto com relação à termotolerância de *L. monocytogenes*.

Hansen e Knøchel (2001) também avaliaram a multiplicação de *L. monocytogenes* termicamente injuriada e pré-exposta a choque térmico (46 °C, 30 min) ou com leve aumento de temperatura (0,3 °C/min) antes da injúria térmica em *sous vide beef* após diferentes temperaturas de aquecimento. Os autores verificaram também a influência da fase de crescimento (logarítmica ou estacionária), pH da carne (5,6 a 6,2) e temperatura de estocagem (3, 5 e 10 °C) após um período de 30 dias. *L. monocytogenes* 13-249 na fase logarítmica e estacionária mostrou multiplicação similar em carne crua fatiada embalada a vácuo e mantida sob refrigeração com pH 6,2. Em pH 5,6 não houve multiplicação a 3 °C, enquanto a 10 e 20 °C foi observada multiplicação para a população em fase logarítmica. *L. monocytogenes* em fase estacionária injuriada termicamente, com 95%-99% das células injuriadas na população sobrevivente (medida pelo plaqueamento diferencial em meio enriquecido *versus* meio seletivo após cozimento *sous vide*), não se multiplicaram ou foram recuperadas da injúria subletal em *sous vide beef* a 3 °C, o mesmo não ocorrendo a 10 e 20 °C. Para *L. monocytogenes* na fase logarítmica, a injúria térmica ocorreu rapidamente e  $\geq 99,9\%$  de injúria térmica foi observada, apesar dos valores de pasteurização mais baixos e de uma redução logarítmica menor, quando comparada a células da fase estacionária. Culturas expostas a choque térmico ou adaptadas termicamente comportaram-se da mesma maneira que células não estressadas, sem multiplicação a 3 °C, exceto uma fase lag mais longa em *sous vide beef* processados com leve aumento de temperatura e em carne com pH 5,6, a 10 °C. Apesar de o processamento com leve aumento de temperatura aumentar discretamente a sobrevivência de *L. monocytogenes* 13-249 em carne cozida, os autores constataram não haver indicação de um potencial na multiplicação subsequente das células sobreviventes.

Taormina e Beuchat (2002) determinaram a termotolerância de *L. monocytogenes* submetida a estresse alcalino em exudatos de salsichas. Os resultados revelaram que valor  $D_{59\text{ }^{\circ}\text{C}}$  foi significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) em relação à tolerância térmica entre as células submetidas ao meio alcalino e células do tratamento-controle (água). O aquecimento das células expostas a solução 1% de sanitizante alcalino com baixa formação de espuma contendo solventes em exudato de salsichas com alto teor de gordura e alto teor de sódio resultou em um valor  $D_{59\text{ }^{\circ}\text{C}}$  significativamente menor ( $P < 0,05$ ) do que no tratamento-controle e em solução 1% de sanitizante alcalino não butírico e em caldo triptose fosfato com pH 10. Células adaptadas em meio alcalino (caldo triptose fosfato com pH 10) apresentaram um valor  $D_{59\text{ }^{\circ}\text{C}}$  significativamente menor ( $P < 0,05$ ) do que células expostas a sanitizantes alcalinos, mas o valor  $D_{59\text{ }^{\circ}\text{C}}$  foi diferente do obtido no tratamento-controle. Células expostas à solução de 1% de sanitizante alcalino não butírico, posteriormente aquecidas em exudatos de salsichas de baixo teor de gordura e baixo teor de sódio, apresentaram um valor  $D_{62\text{ }^{\circ}\text{C}}$  significativamente ( $P < 0,05$ ) menor do que células que haviam sido expostas ao tratamento-controle, à solução de 1% de sanitizante alcalino com baixa formação de espuma, e caldo triptose fosfato com pH 10. Os autores concluíram que a termotolerância de *L. monocytogenes* não foi afetada pela formulação do exudato de salsicha, bem como que a exposição de *L. monocytogenes* a alto pH, por vários minutos e em solução 1% de sanitizantes alcalinos por 48 horas em meio nutritivo de caldo triptose fosfato, não alterou a termorresistência do patógeno.

Lemaire et al. (1989) avaliaram a resistência térmica de *L. monocytogenes* em tubo aberto e tubo de capilaridade. Valores D à temperatura de 60 °C em tubo aberto variaram de 1,3 a 6,5 minutos. Quando utilizado tubo de capilaridade, os valores D variaram significativamente ( $P < 0,005$ ) entre as cepas do sorotipo 4 e sorotipo 1, com valores entre 0,02 e 1,4 segundos e 0,05 e 1,5 segundos, respectivamente. A resistência térmica de *L. monocytogenes* em carne bovina foi estudada por Doherty et al. (1998). Não foram observadas diferenças significativas entre os valores D obtidos para carne fatiada embalada em contêineres ou em sacos a vácuo. Foram obtidos valores D de 36,1, 3,53 e 0,33 minutos para carne em contêineres e de 43,5,

3,14 e 0,24 minutos para carne embalada a vácuo, para temperaturas de 50, 55 e 60 °C, respectivamente.

Glass e Doyle (1989) pesquisaram a destruição e inativação térmica de *L. monocytogenes* em salame do tipo *beaker* e *pepperoni*. Estudos preliminares em salame do tipo *beaker* demonstraram que tratamentos térmicos de 51,7 °C por 8 horas ou 57,2 °C por 4 horas reduziram a população de *L. monocytogenes* em mais de 2 log<sub>10</sub> UFC/grama, entretanto o patógeno foi detectado em ambos os tratamentos pelo procedimento de enriquecimento em uma de duas amostras. O aquecimento de salame do tipo *beaker* a uma temperatura interna de 62,8 °C inativou o patógeno a níveis não detectáveis. Quando o salame do tipo *pepperoni* foi aquecido a 51,7 °C por 4 horas após processo fermentativo e antes da etapa de maturação, a população de *L. monocytogenes* não foi inativada do produto, o que ocorreu quando o produto foi aquecido a 51,7 °C por 4 horas após a etapa de maturação. Segundo os autores, talvez a injúria do patógeno tenha sido devido ao estresse combinado da produção de ácido láctico durante o processo fermentativo, do aquecimento a 51,7 °C e do processo de maturação (secagem), e que inativação seja devido ao estresse adicional durante a estocagem a 4°C.

## 2.11 Referências Bibliográficas

1. AHAMAD, N.; MARTH, E. H. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35 °C in triptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. **J. Food Protect.**, v. 52, n. 10, p. 688-695, 1989.
2. ASSIS, M. A.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Incidence of *Listeria* spp. and *Salmonella* spp. in horsemeat for human consumption. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 62, p. 161-164, 2000.
3. AURELI, P.; CONSTANTINI, A.; ZOLEA, S. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Protect.**, v. 55, n. 5, p. 344-348, 1992.

4. BARNES, R.; ARCHER, P.; STRACK, J.; ISTRE, G. R. Listeriosis associated with consumption of turkey franks. **Morbid. Mortal. Weekly Rpt.**, v. 38, p. 267-268, 1989.
5. BEDIE, G. K.; SAMELIS, J.; SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SCANGA, J. A.; SMITH, G. C. Antimicrobials in the formulation to control *Listeria monocytogenes* postprocessing contamination on frankfurters stored at 4 °C in vacuum-packages. **J. Food Protect.**, v. 64, p. 1949-1955, 2001.
6. BENEDICT, R. C. *Listeria monocytogenes*: physiology and metabolism. In: MILLER, A. J.; SMITH, J. L.; SOMKUTI, G. A. (Ed.). **Foodborne listeriosis**. 1990. p. 13-24.
7. BERRY, E. D.; HUTKINS, R. W.; MANDIGO, R. W. The use of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* to control post processing *Listeria monocytogenes* contamination of frankfurters. **J. Food Protect.**, v. 54, p. 681-686, 1991.
8. BERSOT, L. S.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Sci.**, v. 57, p. 13-17, 2001.
9. BESSE, N. G. Influence of various environmental parameters and of detection procedures on the recovery of stressed *L. monocytogenes*. **Food Microbiol.**, v. 19, p. 221-234, 2002.
10. BEUMER, R. R.; GIFFEL, M. C.; ANTHONIE, S. V. R.; COX, L. J. The effect of acriflavine and nalidixic acid on the growth of *Listeria* spp. in enrichment média. **Food Microbiol.**, v. 13, p. 137-148, 1996.
11. BHADURI, S.; SMITH, P.W.; PALUMBO, S. A.; TURNER-JONES, C.; SMITH, J. L.; MARMER, B. S.; BUCHANAN, R. L.; ZAIKA, L. L.; WILLIAMS, A. C. Thermal destruction of *L. monocytogenes* in liver sausage slurry. **Food Microbiol.**, v. 8, p. 75-78, 1991.

12. BILLE, J.; CATIMEL, B.; BANNERMAN, E.; JAQUET, C.; YERSIN, M-N. et al. API Listeria, a new and promising one day-system to identify *Listeria* isolates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 1857-1860, 1992.
13. BLOM, H.; NERBRINK, E.; DAINTY, R.; HAGTVEDT, T.; BORCH, E.; NISSEN, H.; NESBAKKEN, T. Addition of 2.5% lactate and 0.25% acetate controls growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, sensory acceptable servalet sausage and cooked ham stored at 4°C. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 38, p. 71-76, 1997.
14. BOYLE, D. L.; SOFOS, J. N.; SCHMIDT, G. R. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in a meat slurry and in ground beef. **J. Food Sci.**, v. 55, p. 327-329, 1990.
15. BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 2 de Janeiro de 2001. Revoga a Portaria SVS/MS Lei nº 451, de 19 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. **Diário Oficial**. Brasília, 10 de janeiro de 2001.
16. BREDHOLT, S.; NESBAKKEN, T.; HOLCK, A. Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas-packaged meat. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 53, p. 43-52, 1999.
17. BROSCH, R.; CHEN, J.; LUCHANSKY, J. B. Pulsed-field fingerprinting of Listeriae: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 2584-2592, 1994.
18. BRUL, S.; COOTE, P. Preservatives agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 50, p. 1-17, 1999.
19. BUCHANAN, R. L. Advances in cultural methods for the detection of *Listeria monocytogenes*. In: **Foodborne Listeriosis**. MILLER, A. J.; SMITH, J. L.; SOMKUTI, G. A. (Ed.). 1990. p. 85-95.

20. BUCHANAN, R. L.; M. H., GOLDEN. Interaction of citric acid concentration and pH on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. **J. Food Protect.**, v. 57, p. 567-570, 1994.
21. BUCHANAN, R. L.; PHILLIPS, J. G. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Protect.**, v. 53, p. 370-376, 1990.
22. BUCHRIESER, C.; BROSH, R.; CATIMEL, R. B.; ROCOURT, J. A new view of human listeriosis epidemiology: pulsed-field gel electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. **Can. J. Microbiol.**, v. 36, p. 395-401, 1993.
23. BULA, C. J.; BILLE, J.; GLAUSER, M. P. An epidemic of food-borne listeriosis in Western Switzerland: description of 57 cases involving adults. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. 66-72, 1994.
24. BUNCIC, S.; FITZGERALD, C. M.; BELL, R. G.; HUDSON, J. A. Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperature. **J. Food Safety.**, v. 15, p. 247-264, 1995.
25. BUNCIC, S.; PAUNOVIC, L.; RADISIC, D. The fate of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages and in vacuum-packaged frankfurters. **J. Food Protect.**, v. 54, p. 413-417, 1991.
26. CAMPILLO, J. I. G.; DOMÍNGUEZ-FERNÁNDEZ, M. C.; ZUMALACÁRREGUI RODRÍGUEZ, J. M. Incidencia de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 en carnes y productos carnicos comercializados en Castilla y Leon. **Alimentaria**, v. 303, p. 71-75, 1999.
27. CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; GARGIA-ARIAS, M. T.; MORENO, B.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. C. Evaluation of Fraser broth to isolate *Listeria* from poultry. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v. 33, p. 560-563, 2000.

28. CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; PRIETO, M.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. C.; MORENO, B. Comparison of PALCAM and modified Oxford plating media for isolation of *Listeria* species in poultry meat following UVM II or Fraser secondary enrichment broths. **Food Microbiol.**, v. 18, p. 555-563, 2001.
29. CARROLL, S. A.; CARR, L. E.; MALLINSON, E. T. et al. Development and evaluation of a 24-hour method for the detection and quantification of *Listeria monocytogenes* in meat products. **J. Food Protect.**, v. 63, p. 347-353, 2000.
30. CASSIDAY, P. K.; BRACKETT, R. E.; BEUCHAT, L. R. Evaluation of ten selective direct plating media for enumeration of *Listeria monocytogenes* in hams and oysters. **Food Microbiol.**, v. 6, p. 113-125, 1989.
31. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreak of listeriosis – United States, 1998-1999. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 47, p. 1117-1118, 1998.
32. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreak of listeriosis - United States, 2000. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 49, n. 50, p. 1129-1130, 2000.
33. CHEN, N.; SHELEF, L. A. Relationship between water activity, salts of lactic acids, and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat system. **J. Food Protect.**, v. 55, p. 574-578, 1992.
34. COLBURN, K. G.; KAYSNER, C. A.; ALBEYTA, C.; WEKELL, M. M. *Listeria* species in a California cost estuarine environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2007-2011, 1990.
35. COOK, L. V. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg, and environmental samples. Chapter 8. In: **USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook**, 3<sup>rd</sup> ed., Revision 2, 1999.
36. CORDANO, A. M.; ROCOURT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 70, p. 175-178, 2001.

37. CORNU, M.; KALMOKOFF, M.; FLANDROIS, J-P. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 73, p. 261-274, 2002.
38. CURIALE, M. S.; LEWUS, C. Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *J. Food Protect.*, v. 57, p. 1048-1051, 1994.
39. CUTTER, C. N. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. **J. Food Protect.**, v. 63, p. 601-607, 2000.
40. DALTON, C. B.; AUSTIN, C. C.; SOBEL, J.; HAYES, P. S.; BIBB, W. F.; GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B.; PROCTOR, M. E.; GRIFFIN, P. M. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **N. Engl. J. Med.**, v. 336, p. 100-105, 1997.
41. DE MARTINIS, E. C. P.; CRANDALL, A. D.; MAZZOTA, A. S.; MONTVILLE, T. J. Influence of pH, salt, and temperature on nisin resistance in *Listeria monocytogenes*. **J. Food Protect.**, v. 60, p. 420-423, 1997.
42. DESTRO, M. T.; SERRANO, A. M.; KABUKY, D. Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control.**, v. 2, p. 110-112, 1991.
43. DEVER, F. P.; SCHAFFNER, D. W.; SLADE, P. J. Methods for the detection of food-borne *Listeria monocytogenes* in the U.S. **J. Food Safety.**, v. 13, p. 263-292, 1993.
44. DEVLIEGHERE, F.; GEERAERD, A. H.; VERSYCK, K. J.; BERNAERT, H.; VAN IMPE, J. F.; DEBEVERE, J. shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 58, p. 93-106, 2000.
45. DOHERTY, A. M.; MMAHON, C. M. M.; SHERIDAN, J. J.; BLAIR, I. J.; MDOWELL, D. A.; HEGARTY, T. Thermal resistance of *Yersinia enterocolitica*

- and *Listeria monocytogenes* in meat and potato substrates. **J. Food Safety.**, v. 18, p. 69-83, 1998.
46. DONALD, A. S.; FENLON, D. R.; SEDDON, B. The relationship between ecophysiology, indigenous microbiota and growth of *Listeria monocytogenes* in grass silage. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 79, p. 141-148, 1995.
  47. DONNELLY, C. W. Detection and isolation of *Listeria monocytogenes* from food samples: implications of sublethal injury. **J. AOAC Int.**, v. 85, p. 495-500, 2002.
  48. DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*. In: HUI, Y. H.; GORHAM, J. R.; MURREL, K. D.; CLIVER, D. O. (Ed.). **Foodborne Disease Handbook**. New York: Marcel Dekker. 1994. p. 215-252.
  49. DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition Reviews**, v. 59, p. 183-194, 2001.
  50. DOORES, S. Organic acids. In: Davidson, P. M.; Branen, A. L. 2 ed. **Antimicrobials in foods**. New York: Marcel Dekker. 1993. p. 95-136.
  51. DOYLE, M. E.; MAZZOTTA, A. S.; WANG, T.; WISEMAN, D. W.; SCOTT, V. N. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Protect.**, v. 64, p. 410-429, 2001.
  52. DUFFY, E. A.; BELK, K. E.; SOFOS, J. N.; BELLINGER, G. R.; PAPE, A.; SMITH, G. C. Extent of microbial contamination in United States pork retail products. **J. Food Protect.**, v. 64, p. 172-178, 2001.
  53. EL-SHENAWY, M. A.; MARTH, E. H. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of sodium propionate together with food acids. **J. Food Protect.**, v. 55, p. 241-245, 1992.
  54. FABER, J. M.; DALEY, E. Presence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated meats. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 22, p. 33-42, 1994.
  55. FAIN JR, A. R.; LINE, J. E.; MORAN, A. B.; MARTIN, L. M.; LECHOWICH, R. V.; CAROSELLA, J. M.; BROWN, W. L. Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott A: D-value and z-value determinations in ground beef and turkey. **J. Food Protect.**, v. 54, p. 756-761, 1991.

56. FAITH, N. G., YOUSEF, A. E.; LUCHANSKY, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by liquid smoke and isoeugenol, a phenolic component found in smoke. **J. Food Safety**, v. 12, p. 303-314, 1992.
57. FARBER, J. M. Current research on *Listeria monocytogenes* in foods: an overview. **J. Food Protect.**, v. 56, p. 640-643, 1993.
58. FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. In: RYSER, E. T; MARTH, E. H. (Ed.). **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker. 1999. p. 505-563.
59. FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 476-511, 1991.
60. FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; DUNFIELD, S.; PRESCOTT, R. The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters Appl. Microbiol.**, v. 9, p.181-183, 1989b.
61. FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; JOHNSTON, M. A. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. **J. Food Protect.**, v. 52, p. 456-458, 1989a.
62. FARBER, J.; HARWIG, J. The Canadian position on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Food Control.**, v. 7, p. 253-258, 1996.
63. FENLON, D. R. *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In: **Listeria, listeriosis, and food safety**. RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (Ed.). New York: Marcel Dekker. 1999, p. 21-37.
64. FENLON, D. R. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 59, p. 537-543, 1985.
65. FENLON, D. R.; WILSON, J.; DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 81, p. 641-650, 1996.
66. FLEMING, D. W.; COCHI, S. L.; MACDONALD, K. L.; BRODUM, J.; HAYES, P. S.; PLIKAYTIS, B. D.; HOMES, M. B.; AUDURIER, A.; BROOME, C. V.;

- REINGOLD, A. L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 312, p. 404-407, 1985.
67. FOEGEDING, P. M.; BUSTA, F. F. Chemical food preservatives. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection, sterilization and preservation**. 4. ed. Lea and Febiger, Philadelphia. 1991. p. 802-832.
68. FOOD SAFETY INSPECTION SERVICE; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. [http://www.fsis.usda.gov/OA/recalls/rec\\_intr.htm](http://www.fsis.usda.gov/OA/recalls/rec_intr.htm), 2001.
69. FRANCES, N.; HORNBY, H.; HUNTER, P. R. The isolation of *Listeria* species from fresh water sites in Cheshire and North wales. **Epidemiol. Infect.**, v. 107, p. 235-238, 1991.
70. GELLIN, B. G.; BROOME, C. V. Listeriosis. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 261, p. 1313-1320, 1989.
71. GENIGEORGIS, C. A.; OANCA, P.; DUTULESCU, D. Prevalence of *Listeria* spp. in Turkey meat at the supermarket and slaughterhouse level. **J. Food Protect.**, v. 53, p. 282-288, 1990.
72. GIOVANNACCI, I.; RAGIMBEAU, C.; QUEGUINER, S.; SALVAT, G.; VENDEUVRE, J. L.; CARLIER, V.; ERMEL, G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants. Use of RAPD, PFGE, and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 53, p. 127-140, 1999.
73. GLASS, K. A.; DOYLE, M. P. Fate and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in Beaker sausage and Pepperoni. **J. Food Protect.**, v. 52, p. 226-231, 1989.
74. GOLDEN, M. H.; BUCHANAN, R. L.; WHITING, R. C. Effect of sodium acetate or sodium propionate with EDTA and ascorbic acid on the inactivation of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Safety.**, v. 15, p. 53-65, 1995.
75. GRAU, F. H.; VANDERLINDE, P. B. Occurrence, numbers, and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. **J. Food Protect.**, v. 55, p. 4-7, 1992.

76. HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plants extracts. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, p. 985-990, 1999.
77. HANSEN, T. B.; KNØCHEL, S. Factors influencing resuscitation and growth of heat injured *Listeria monocytogenes* 13-249 in *sous vide* cooked beef. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 63, p. 135-147, 2001.
78. HANSEN, T. B.; KNØCHEL, S. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* during rapid and slow heating in *sous vide* cooked beef. **Letters Appl. Microbiol.**, v. 55, p. 425-428, 1996.
79. HAO, Y.; BRACKETT, R. E.; DOYLE, M. P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plants extracts in refrigerated cooked beef. **J. Food Protect.**, v. 61, p. 307-312, 1998.
80. HARMAYANI, E.; SOFOS, J. N.; SCHMIDT, G. R. Fate of *Listeria monocytogenes* in raw and cooked ground beef with meat processing additives. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 18, p. 223-232, 1993.
81. HAYES, P. S.; GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B.; AJELLO, W. G.; MALCOLM, G. B.; WEAVER, R. E.; RANSON, R.; DEEVER, K.; PLIKAYTIS, B. D.; SCHUCHAT, A.; WENGER, J. D.; PINNER, R. W.; BROOME, C. V.; *LISTERIA* STUDY GROUP. Comparison of three selective enrichment methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. **J. Food Protect.**, v. 55, p. 952-959, 1992.
82. HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D. P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 615-620, 2000.
83. HOLT, J.G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Regular, nonsporing gram-positive rods. Genus *Listeria*. In: HENSLEY, W. R. (Ed.). 9. ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams Wilkins. 1994. p. 565-570,

84. HOUSTMA, P. C.; DeWIT, J. C.; ROMBOUITS, F. M. Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms occurring in meat products. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 20, p. 247-257, 1993.
85. HOWARD, P. J.; HARSONO, K. D.; LUCHANSKY, J. B. Differentiation of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri* by pulsed-field gel electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 492-496, 1992.
86. HUANG, I-P. D.; YOUSEF, A. E.; MARTH, E. H.; MATTHEWS, M. E. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in chicken gravy. **J. Food Protect.**, v. 61, p. 307-312, 1998.
87. HUDSON, J. A.; MOTT, S. J.; DELACY, K. M.; EDRIDGE, A. L. Incidence and coincidence of *Listeria* spp., motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* on ready-to-eat meat fleshfoods. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 16, p. 99-108, 1992.
88. ISLAM, M.; CHEN, J.; DOYLE, M. P.; CHINNAN, M. Control of *Listeria monocytogenes* on turkey frankfurters by generally-recognized-as-safe preservatives. **J. Food Protect.**, v. 65, p. 1411-1416, 2002.
89. ITA, P. S.; HUTKINS, R. W. Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric, and hydrochloric acids. **J. Food Protect.**, v. 54, p. 15-19, 1991.
90. JAY, J. M. Foodborne listeriosis. In: JAY, J. M. (Ed.). **Modern food Microbiol.** New York: AVI. Cap. 22, p. 478-506, 1996.
91. JOHNSON, J. L., DOYLE, M. P.; CASSENS, R. G.; SCHOENI, J. L. Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 497-501, 1988.
92. JOHNSON, J. L.; DOYLE, M.P.; CASSENS, R. G. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products: a review. **J. Food Protect.**, v. 53, p. 81-91, 1990.
93. JUNCHER, D.; VESTERGAARD, C. S.; SOLTOFT-JENSEN, J.; WEBER, C. J.; BERTELSEN, G.; SKIBSTED, L. H. effects of chemical hurdles on

- microbiological and oxidative stability of a cooked cured emulsion type meat product. **Meat Sci.**, v. 55, p. 483-491, 2000.
94. JUNEJA, V. K. Thermal inactivation of microorganisms. In: JUNEJA, V. K.; SOFOS, J. N. **Control of food borne microorganisms**. New York: Marcell Dekker, 2002. p. 13-53.
  95. KANG, D.; FUNG, D. Y. C. Thin agar layer method for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. **J. Food Protect.** v. 62, p. 1346-1349, 1999.
  96. KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 2939-2845, 1995.
  97. KLIMA, R. A.; MONTVILLE, T. J. The regulatory and industrial responses to listeriosis in the USA: a paradigm for dealing with emerging foodborne pathogens. **Trends Food Science Tech.**, v. 6, p. 87-93, 1995.
  98. KNABEL, S. J. Optimized, one-step, recovery-enrichment broth for enhanced detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk and hot dogs. **J. AOAC Int.**, v. 85, p. 501-504, 2002.
  99. KORNACKI, J. L.; EVANSON, D. J.; REID, W.; ROWE, K.; FLOWERS, R. S. Evaluation of the USDA protocol for detection of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Protect.**, v. 56, p. 441-443, 1993.
  100. KUHN, M.; GOEBEL, W. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. In: **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. RYSER, E. T and MARTH, E. H (Ed.). New York: Marcell Dekker. 1999. p. 131-244.
  101. LAI, E.; BIRREN, B. W.; CLARK, S. M.; SIMON, M. I.; HOOD, L. Pulsed field gel electrophoresis. **Biotechniques**, v. 7, p. 34-42, 1989.
  102. LE MARC, Y.; HUCHET, V.; BOURGEOIS, C. M.; GUYONNET, J. P.; MAFART, P.; THUAULT, D. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH, organic acid concentration. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 73, p. 219-237, 2002.

103. LEMAIRE, V.; CERF, O.; AUDURIER, A. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes*. **Ann. Rech. Vét.**, v. 20, p. 493-500, 1989.
104. LIHONO, M. A.; MENDONÇA, A. F.; DICKSON, J. S.; DIXON, P. M. Influence of sodium pyrophosphate on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in pork slurry and ground pork. **Food Microbiol.**, v. 18, p. 269-276, 2001.
105. LINNAN, M. J., MASCOLA, L.; LOU, X. D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C.; HIRD, D. W.; YONEKURA, M.; HAYES, P.; WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLIKAYTIS, B. D.; FANNIN, S. L.; KLEKS, A.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **N. Engl. J. Med.**, v. 319, p. 823-828, 1988.
106. LOU, L.; YOUSEF, A. E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: **Listeria, listeriosis, and food safety**. RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (Ed.). New York: Marcel Dekker, 1999. p. 131-224.
107. LOVETT, J. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes*. **Food Technol.**, n. 4, p. 172-175, 1988a.
108. LOVETT, J. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 71, p. 658-660, 1988b.
109. LOVETT, J. *Listeria monocytogenes*. In: **Food-borne pathogens**. DOYLE, M. P. (Ed.). New York: Marcel Dekker. 1989. p. 283-310.
110. LOVETT, J.; TWEDT, R. M. *Listeria*. **Food Technol.**, v. 42, p. 188-191, 1988.
111. LUCHANSKY, J. B. Research developments in *Listeria* control and testing. In: **Dairy Sanitization and Product Quality**. International Cheese Technology Exposition. April, 1994. LaCrosse, Wisconsin.
112. MACKEY, B. M.; PRITCHET, C.; NORRIS, A.; MEAD, G. C. Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effect of meat type and curing salts. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 10, p. 251-255, 1990.
113. MARGOLLES, A.; MAYO, B.; REYES-GAVILÁN, C. G. Polymorphism of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains isolated from short-ripened cheeses. **J. Appl. Microbiol.**, v. 84, p. 255-262, 1998.

114. MARRUG, J. D. Bacteriocins, their role in developing natural products. **Food Biotech.**, v. 5, p. 305-312, 1991.
115. MAZZOTA, A.; GOMBAS, D. E. Heat resistance of an outbreak strain of *Listeria monocytogenes* in hot dog batter. **J. Food Protect.** v. 54, p. 321-324, 2001.
116. MBANDI, E.; SHELEF, L. A. Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef bologna. **Int. J. Food Microbiol.** v. 76, p. 191-198, 2002.
117. MBANDI, E.; SHELEF, L. A. Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in meat by combinations of sodium lactate and diacetate. **J. Food Protect.**, v. 64, p. 640-644, 2001
118. McCARTHY, S. A. Pathogenicity of non-stressed, heat-stressed and resuscitated *Listeria monocytogenes*. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 57, p. 2389-2391, 1991.
119. MCCLAIN, D.; LEE, W. H. Development of USDA/FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 71, p. 660-663, 1988.
120. McKELLAR, R. C. Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 60, p. 4219-4223, 1994.
121. McKELLAR, R. C.; MOIR, R.; KALAB, M. Factors influencing the survival and growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of Canadian retails wieners. **J. Food Protect.**, v. 57, p. 387-392, 1994.
122. McLAUCHLIN, J. The identification of *Listeria* species. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 38, p. 77-81, 1997.
123. McLAUCHLIN, J.; HALL, S. M.; VELANI, S. K.; GILBERT, R. J. Human listeriosis and pate: a possible association. **Br. Med. J.**, v. 303, p. 773-775, 1991.
124. MOTLAGH, A. M.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Viability loss of food-borne pathogens by starter culture metabolites. **J. Food Protect.**, v. 54, p. 873-878; 884, 1991.

125. MURIANA, P. M.; QUIMBY, W.; DAVIDSON, C. A.; GROOMS, J. Postpackage pasteurization of ready-to-eat deli meats by submersion heating for reduction of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Protect.**, v. 65, p. 963-969, 2002.
126. MURPHY, R. Y.; MARKS, B. P.; JOHNSON, E. R. Thermal inactivation kinetics of *Salmonella* and *Listeria* in ground chicken breast meat and liquid medium. **J. Food Sci.**, v. 65, p. 706-710, 2000.
127. MURPHY, R. Y.; MARKS, B. P.; JOHNSON, E. R.; JOHNSON, M. G. Inactivation of *Salmonella* and *Listeria* in ground chicken breast meat during thermal processing. **J. Food Protect.**, v. 62, p. 980-985, 1999.
128. NAKAMA, A.; TERAOKA, M.; KOKUBO, Y.; ITOH, T.; MARUYAMA, T.; KANEUCHI, C.; McLAUCHLIN, J. A comparison of *Listeria monocytogenes* serovar 4b isolates of clinical and food origin in Japan by pulsed-field gel electrophoresis. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 24, p. 201-206, 1998.
129. NERBRINK, E.; BORCH, E.; BLOM, H.; NESBAKKEN, T. A model based on absorbance data on the growth rate of *Listeria monocytogenes* and including the effects of pH, NaCl, Na-lactate and Na-acetate. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 47, p. 99-109, 1999.
130. NICKELSON, N.; SCHMIDT, C.W. Taking the hysteria out of *Listeria*: the mechanics of *Listeria* and strategies to find it. **Food Quality**, n. 4, p. 28-34, 1999.
131. NIKU-PAAVOLA, M. -L.; LAITILA, A.; MATTILA-SANDHOLM, T.; HAIKARA, A. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, p. 29-35, 1999.
132. NISSEN, H.; HOLCK, A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Kentucky* in Norwegian fermented, dry sausage. **Food Microbiol.**, v. 15, p. 273-279, 1998.
133. NORTON, D. M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. **J. AOAC Int.**, v. 85, p. 505-515, 2002.

134. OGDEN, S. K.; TAYLOR, A. J.; DODD, C. E. R.; GUERREIRO, I.; BUENDIA, H.; GALLARDO, F. Preservative effect of combined propionic and ascorbic acids on pork meat stored at 25°C. **J. Food Protect.**, v. 60, p. 935-942, 1997.
135. OLLINGER-SNYDER, P.; EL GAZZAR, F.; MATTHEWS, M. E.; MARTH, E. H.; UNKLEBAY, N. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in ground pork prepared with and without soy hulls. **J. Food Protect.**, v. 58, p. 573-576, 1995.
136. PALUMBO, S. A.; SMITH, J. L.; MARMER, B. S.; ZAIKA, L. L.; BHADURI, S.; TURMER-JONES, C.; WILLIAMS, A. C. Thermal destruction of *L. monocytogenes* during liver sausage processing. **Food Microbiol.**, v. 10, p. 243-247, 1993.
137. PALUMBO, S. A.; WILLIAMS, A. C. Control of *Listeria monocytogenes* on the surface of frankfurters by acid treatments. **Food Microbiol.**, v. 11, p. 293-300, 1994.
138. PETRAN, R. L.; ZOTTOLA, E. A. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. **J. Food Sci.**, v. 54, p. 458-460, 1989.
139. PHAN-THANH, L.; MAHOUI, F.; ALIGÉ, S. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.** v. 55, p. 121-126, 2000.
140. POURSHABAN, M.; GIANFRANCHESCHI, GATTUSO, A.; AURELI, P. Use of a molecular typing method to evaluate the control of *Listeria monocytogenes* contamination in a poultry processing plant. **Ital. J. Food Sci.** v. 11, p. 257-264, 1999.
141. PROCTOR, M. E., BROSH, R.; MELLEN, J. W.; GARRET, L. A.; KASPAR, C. W.; LUCHANSKY, J. B. Use of pulsed-field gel electrophoresis to link sporadic cases of invasive listeriosis with recalled chocolate milk. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 3177-3179, 1995.
142. QVIST, S.; SEHESTED, K.; ZEUTHEN, P. Growth suppression of *Listeria monocytogenes* in a meat product. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 24, p. 283-293, 1994.

143. ROBERTS, D. *Listeria monocytogenes* and food: the UK approach. **Dairy Food Environ. Sanit.**, v. 14, p. 198, 200, 202-204, 1994.
144. ROCOURT, J. Taxonomy of the genus *Listeria*. **Infection**, v. 16, p. 89-91, 1988.
145. ROCOURT, J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. (Ed.). **Listeria, listeriosis and food safety**. 2. ed. New York: Marcel Dekker. 1999. p. 1-20.
146. ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food Microbiol: fundamentals and frontiers**. Washington, DC: American Society for Microbiology Press. 1997. p. 337-352.
147. ROERING, A. M., WIERZBA, R. K., IHNOT, A. M.; LUCHANSKY, J. B. Pasteurization of vacuum-sealed packages of summer sausage inoculated with *Listeria monocytogenes*. **J. Food Safety.**, v. 18, p. 49-56, 1998.
148. RUSSEL, A. D. Principles of antimicrobial activity. In: **Disinfection, sterilization and preservation**. 4ed. BLOCK, S. S (Ed.). Philadelphia: Lea and Febiger. 1991. p. 29-58.
149. RYSER, E. T. Foodborne listeriosis. In: RYSER, E. T; MARTH, E. H. (Ed.). **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker. 1999. p. 299-357.
150. RYSER, E. T.; MARTH, E. H. Listeriosis in humans. In: RYSER, E. T; MARTH, E. H. (Ed.). **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker. 1991. p. 45-65.
151. RYSER, E. T; DONNELLY, C. W. *Listeria*. In: DOWNES, F. P.; KEITH, I. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Assoc. 2001. p. 343-356.
152. SAMELIS, J., BEDIE, G. K.; SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SCANGA, J. A.; SMITH G. C. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials

- after postprocess contamination and extended storage of frankfurters at 4°C in vacuum-packages. **J. Food Protect.**, v. 65, p. 299-307, 2002.
153. SCHLECH, W. F., III; LAVIGNE, P. M.; BORTOLUSSI, R. A.; ALLEN, A. C.; HALDANE, E. V.; WORT, A. J.; HIGHTOWER, A. W.; JOHNSON, S. E.; KING, S. H.; NICHOLLS, E. S.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, p. 203-206, 1983.
154. SCHLYTER, J. H.; DEGNAN, A. J.; LOEFFELHOLZ, J.; GLASS, K. A.; LUCHANSKY, J. B. Evaluation of sodium diacetate and ALTA™ 2341 on viability of *Listeria monocytogenes* in turkey slurries. **J. Food Protect.**, v. 56, p. 808-810, 1993a.
155. SCHLYTER, J. H.; GLASS, K. A.; LOEFFELHOLZ, J.; DEGNAN, A. J.; LUCHANSKY, J. B. The effects of diacetate with nitrite, lactate, or pediocin on the viability of *Listeria monocytogenes* in turkey slurries. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 19, p. 271-281, 1993b.
156. SCHOENI, J. L.; BUNNER, K.; DOYLE, M. P. rates of thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beef and fermented beaker sausage. **J. Food Protect.**, v. 54, p. 334-337, 1991.
157. SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 169-183, 1991.
158. SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 169-183, 1991.
159. SEELINGER, H. P. R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: Sneath, P. H. A. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v. 2. The Williams Wilkins Co., Baltimore, USA. 1986. p. 1235-1245.
160. SEELINGER, H. P. R.; JONES, D. Regular, nonsporulating gram-positive rods. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, N. E.; HOLT, J. G. (Ed.). vol. II. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams Wilkins. 1986. p. 1235-1245.

161. SEMAN, D. L.; BORGER, A. C.; MEYER, J. D.; HALL, P. A.; MILKOWSKI, A. L. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in cured ready-to-eat processed meat products by manipulation of sodium chloride, sodium diacetate, potassium lactate, and product moisture content. **J. Food Protect.**, v. 65, p. 651-658, 2002.
162. SENCZEK, D.; STEPHAN, R.; UNTERMANN, F. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2 year period. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 62, p. 155-159, 2000.
163. SHANK, F. R.; ELLIOT, E. L.; WACHSMUTH, I. K.; LOSIKOFF, M. E. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Control.**, v. 7, p. 229-234, 1996.
164. SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of lactates: a review. **J. Food Protect.**, v. 57, p. 445-450, 1994.
165. SHELEF, L. A. Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef or liver during storage at 4 and 25°C. **J. Food Protect.**, v. 52, p. 379-383, 1989.
166. SHELEF, L. A., YANG, Q. Growth suppression of *Listeria monocytogenes* by lactates in broth, chicken, and beef. **J. Food Protect.**, v. 54, p. 283-287, 1991.
167. SHELEF, L. A.; JYOTHI, E. K.; BULGARELLI, M. A. Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. **J. Food Sci.**, v. 49, p. 737-740, 809, 1984.
168. SHERIDAN, J. J.; DUFFY, G.; BUCHANAN, R. L.; McDOWELL, D. A.; BLAIR, I. S. The use of selective and non-selective enrichment broths for the isolation of *Listeria* species from meat. **Food Microbiol.**, v. 11, p. 439-446, 1994.
169. SILK, T. M.; ROTH, T. M. T.; DONNELLY, C. W. Comparison of growth kinetics for healthy and heat-injured *Listeria monocytogenes* in eight enrichment broths. **J. Food Protect.**, v. 65, p. 1333-1337, 2002.
170. SIMÓN, M.; FERRER, M.D. Initial numbers, serovars and phagevars of *Listeria monocytogenes* isolated in prepared food in the city of Barcelona (Spain). **Int. J. Food Microbiol.**, v. 44, p. 141-144, 1998.

171. SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. (Ed.). **Listeria, listeriosis and food safety**. 2. ed. New York: Marcel Dekker. 1999. p. 75-95.
172. SMITH, J. L.; ARCHER, D. L. Heat-induced injury in *Listeria monocytogenes*. **J. Ind. Microbiol.**, v. 3, p. 105-110, 1988.
173. SOFOS, J. N. ; BUSTA, F. F. Chemical food preservatives. In: RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B.; AYLIFFE, G. A. J. (Ed.). **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 2. ed. London: Blackwell Scientific Plublic. 1992. p. 351-386.
174. SOFOS, J. N.; BEUCHAT, L. R.; DAVIDSON, P. M.; JOHNSON, E. A. **Naturally occurring antimicrobials in food**. Council for Agricultural Science and Technology. Task Force Report n.132. 1998. 103 p.
175. SØLVE, M.; BOEL, J., NØRRUNG, B. Evaluation of a monoclonal antibody able to detect live *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 57, p. 219-224, 2000.
176. SORRELS, K. M.; ENIGL, D. C.; HATFIELD, J. R. Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Protect.**, v. 52, p. 571-573, 1989.
177. STEKELENBURG, F. K.; KANT-MUERMANS, M. L. T. Effects of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sensory quality and development of a strain of *Lactobacillus curvatus* and *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 66, p. 197-203, 2001.
178. STEVENS, K. A.; SHELDON, B. W.; KLAPES, N. A.; KLAENHAMMER, T. R. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram negative bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 3613-3615, 1991.
179. STILES, M. E.; HASTINGS, J. W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 2, p. 247-251, 1991.

180. TAORMINA, P. J.; BEUCHAT, L. R. Survival and growth of alkali-stressed *Listeria monocytogenes* on beef frankfurters and thermotolerance in frankfurters exudates. **J. Food Protect.**, v. 65, p. 291-298, 2002.
181. TAPPERO, J.; SCHUCHAT, A.; DEEVER, K.; MASCOLA, L.; WENGER, J. D. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness on prevention efforts. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 273, p. 1118-1122, 1995.
182. THAYER, D. W.; BOYD, G. Irradiation and modified atmosphere packaging for the control of *Listeria monocytogenes* on turkey meat. **J. Food Protect.**, v. 62, p. 1136-1142, 1999.
183. THAYER, D. W.; BOYD, G. Reduction of normal flora by irradiation and its effect on the ability of *Listeria monocytogenes* to multiply on ground turkey meat stored at 7° C when packaged under modified atmosphere. **J. Food Protect.**, v. 63, p. 1702-1706, 2000.
184. TIENUNGOON, S.; RATKOWSKY, D. A.; McMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 4979-4987, 2000.
185. TOMPKIN, R. B.; CHRSTIANSEN, L. N.; SHAPARIS, A. B.; BAKER, R. L.; SCHROEDER, J. M. Control of *Listeria monocytogenes* in processed meats. **Food Australia**, v. 44, 370-376, 1992.
186. UNDA, J. R.; MOLINS, R. A.; WALKER, H. W. *Clostridium sporogenes* and *Listeria monocytogenes*: survival and inhibition in microwave-ready beef roasts containing selected antimicrobials. **J. Food Sci.**, v. 56, p. 198-205, 1991.
187. USDA Backgrounder. **FSIS Strategies for addressing *Listeria monocytogenes***. United States Department of Agriculture, Food Safety Inspection Service. February, 1999.
188. VANDERLINDE, P. B.; GRAU, F. H. Detection of *Listeria* spp. in meat and environmental samples by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **J. Food Protect.**, v. 54, p. 230-231, 1991.

189. VAUGHAN, E. E.; CAPLICE, E.; LOONEY, R.; O'ROURKE et al. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. **J. Appl. Bacteriology.**, v. 76, p. 118-123, 1994.
190. VELANI, S.; GILBERT, R. J. *Listeria monocytogenes* in prepacked ready-to-eat sliced meats. **PHLS Microbiol. Digest.**v. 7, p. 56, 1990.
191. WANG, C.; MURIANA, P. Incidence of *Listeria monocytogenes* in packages of retail franks. **J. Food Protect.**, v. 57, p. 382-386, 1994.
192. WARBURTON, D. W.; FARBER, J. M.; POWELL, C.; TIWARI, N. P.; READ, S. et al. Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiol.**, v. 9, p. 127-145, 1992.
193. WEAVER, R. A.; SHELEF, L. A. Antilisterial activity of sodium, potassium or calcium lactate in pork liver sausage. **J. Food Safety**, v. 13, p. 133-146, 1993.
194. WEDERQUIST, H. J.; SOFOS, J. N.; SCHMIDT, G. R. *Listeria monocytogenes* inhibition in refrigerated vacuum packaged turkey bologna by chemical additives. **J. Food Sci.**, v. 59, p. 498-500, 516, 1994.
195. WEHR, H. M. *Listeria monocytogenes*- a current dilemma. **J. Ass. Off. Anal. Chem.**, v. 70. p. 769-772, 1987.
196. WEIDMANN, M.; CZAJKA, J.; BRAT, N. ; BODIA, M.; SMITH, M.C.; DIVERS, T. J.; BATT, C.A. Diagnosis and epidemiological association of *Listeria monocytogenes* strains in two outbreaks of listerial encephalitis in small ruminants. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 991-996, 1994.
197. WEIS, J.; SEELIGER, H. P. R. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. **Appl. Microbiol.**, v. 30, p. 29-32, 1975.
198. WILLIAMS, R. C.; GOLDEN, D. A. Influence of modified atmospheric storage, lactic acid, and NaCl on survival of sublethally heat-injured *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 64, p. 379-386, 2001.
199. WIT, J. C.; ROMBOOTS, F. M. Antimicrobial activity of sodium lactate. **Food Microbiol.** v. 7, p. 113-120, 1990.

200. YEN, L. C.; SOFOS, J. N. ; SCHIMIDT, G. R. Effect of meat curing ingredients on thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in ground pork. **J. Food Protect.**, v. 54, p. 408-412, 1991.
201. YEN, L. C.; SOFOS, J. N.; SCHIMIDT, G. R. Destruction of *Listeria monocytogenes* by heat in ground pork formulated with kappa-carrageenan, sodium lactate and the algin/calcium meat binder. **Food Microbiol.**, v. 9, p. 223-230, 1992.
202. YOUNG, K. M.; FOEGEDING, P. M. Acetic, lactic, citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracellular pH. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 74, p. 515-520, 1993.
203. YOUSEF, A. E.; LUCHANSKY, J. B.; DEGNAN, A. J.; DOYLE, M. P. Behavior of *Listeria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or Pediocin AcH during storage at 4 or 25°C. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 1461-1467, 1991.
204. YU, L. S. L.; FUNG, D. Y. C. Comparisons of selected methods with the Fung-Yu tube procedure for determining *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meats. **J. Food Protect.**, v. 55, p. 349-355, 1992.
205. ZAIKA, L. L.; PALUMBO, S. A.; SMITH, J. L.; DEL CORRAL, F.; BHADURI, S.; JONES, C. O.; KIM, A. H. Destruction of *Listeria monocytogenes* during frankfurter processing. **J. Food. Protect.**, v. 53, p. 18-21, 1990.

### **3      CAPÍTULO I**

**COMPARAÇÃO DO MÉTODO DE ENRIQUECIMENTO DO UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA)/FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (FSIS), MÉTODO DE ENXÁGÜE DE AMOSTRA DO USDA/AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE (ARS) E MÉTODO DE ENXÁGÜE DO PRODUTO NA EMBALAGEM DO USDA/ARS PARA RECUPERAÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM SALSICHAS EMBALADAS A VÁCUO**

### 3.1 TÍTULO

Recovery of *Listeria monocytogenes* from vacuum-sealed packages of frankfurters: comparison of the U.S. Department of Agriculture (USDA) Food Safety and Inspection Service Product Composite Enrichment Method, the USDA Agricultural Research Service (ARS) Product Composite Rinse Method, and the USDA-ARS Package Rinse Method \*.

LUCHANSKY, J. B.; PORTO, A. C. S.; WALLACE, F. M.; CALL, J. E. **Journal Food Protection**, v. 65, n. 3, p. 567-570, 2002.

\*Trabalho parcial apresentado no Annual Meeting do Institute of Food Technologists, New Orleans, Louisiana, USA, June 23-27, 2001 (Wallace et al., 2001).

### 3.2 RESUMO

Foi realizado um estudo comparativo entre três métodos de enriquecimento para de *Listeria monocytogenes* em salsichas embaladas a vácuo preparadas comercialmente. Salsichas foram inoculadas com uma mistura do patógeno de 22 e 20.133 UFC (n=3) por embalagem. A presença e os números do patógeno foram determinados pelos métodos: i) de enriquecimento do United States Department of Agriculture (USDA)/Food Safety and Inspection Service (FSIS), utilizando enriquecimento seletivo de 25 g de amostra do produto com subsequente plaqueamento em meio ágar seletivo; ii) enxágüe de amostra do USDA/Agricultural Research Service (ARS), com enxágüe de 25 g da amostra com água peptonada a 0,1% e subsequente semeadura em superfície em meio ágar seletivo de uma alíquota do fluido resultante; e iii) enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS, utilizando 25 ml de água peptonada a 0,1% para enxágüe da amostra total da embalagem e subsequente semeadura em superfície em meio ágar seletivo de uma alíquota do fluido resultante. Para embalagens inoculadas com 20.133 UFC, *L. monocytogenes* foi recuperada em uma freqüência (porcentagem de embalagens positivas) de 100% para cada um dos métodos testados. O patógeno foi recuperado em uma eficiência (porcentagem de isolamento de *L. monocytogenes*) de 43% e 94% para o método de enxágüe de amostra do USDA/ARS e pelo método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS, respectivamente. Para embalagens inoculadas com 22 UFC, *L. monocytogenes* foi recuperada nas freqüências de 17%, 10% e 100% pelo método de enriquecimento do USDA/FSIS, método de enxágüe de amostra do USDA/ARS e pelo método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS, respectivamente. O patógeno foi recuperado nas eficiências de 20% e 95% para os métodos de enxágüe de amostra do USDA/ARS e de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS, respectivamente. Em estudo relacionado, somente o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS detectou o patógeno em 60 embalagens de cinco diferentes marcas de salsichas adquiridas no comércio local. Esses dados estabelecem que o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS foi extremamente mais sensível, assim como rápido e fácil, do que o método aprovado de enriquecimento do USDA/FSIS ou do que o método de enxágüe de amostra do USDA/ARS em determinar a presença ou ausência de *L. monocytogenes* e estabelecer números do patógeno presente na superfície de produtos prontos para consumo, como, por exemplo, salsichas.

**Palavras-chave:** *L. monocytogenes*; salsichas; métodos de enriquecimento; patógeno; produtos cárneos prontos para consumo; microbiologia de alimentos.

### 3.3 ABSTRACT

This study compared three methods for the recovery of *Listeria monocytogenes* from commercially prepared and vacuum-packaged frankfurters that were inoculated with a five-strain mixture of this pathogen at averages of 22 and 20,133 CFU per package over the three trials. The presence and levels of the pathogen were determined by (i) the U.S. Department of Agriculture (USDA)/Food Safety and Inspection Service (FSIS) product composite enrichment method, involving the selective enrichment of a 25-g composite of product and the subsequent plating of this product onto selective agar plates; (ii) the USDA/Agricultural Research Service (ARS) product composite rinse method, involving the rinsing of a 25-g composite of product with 0.1% peptone water and the subsequent plating of a portion the rinse fluid directly onto selective agar plates; (iii) the USDA/ARS package rinse method, involving the use of 25 ml of 0.1% peptone water to rinse the entire contents of a package and the subsequent plating of a portion the rinse fluid directly onto selective agar plates. For packages inoculated with 20,133 CFU, *Listeria monocytogenes* was recovered at efficiencies (percentages of packages positive) of 100% by each of the three methods. The pathogen was recovered at efficiencies (percentages of recovery *Listeria monocytogenes*) of 43 and 94% with the USDA/ARS product composite rinse method and the USDA/ARS package rinse method, respectively. For packages inoculated with 22 CFU, *Listeria monocytogenes* was recovered at frequencies of 17, 10, and 100% by the USDA/FSIS product composite enrichment method, the USDA/ARS product composite rinse method, and the USDA/ARS package rinse method, respectively. The pathogen was recovered at efficiencies of 20 and 95% with the USDA/ARS product composite rinse method and the USDA/ARS package rinse method, respectively. In a related study, the USDA/ARS package rinse method was the only method that detected the pathogen in 60 packages from each of five brands of frankfurters purchased from local grocery stores. These data establish that the USDA/ARS package rinse method is markedly more sensitive, as well as demonstrably more rapid and facile than either approved USDA/FSIS product composite enrichment method or the USDA/ARS product composite rinse method in determining the presence or absence of *Listeria monocytogenes* and establishing the levels of the pathogen that may be on the surface of ready-to-eat meat foods such as frankfurters.

**Key words:** *L. monocytogenes*, frankfurters, methods of recovery, pathogen, ready-to-eat meats, food safety.

### 3.4 INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes* pode estar presente em diversos alimentos, incluindo produtos prontos para consumo como patê, produtos cárneos de *delicatessen* e salsichas (FARBER; PETERKIN, 1991; GILLESPIE et al., 2000). De acordo com SHANK et al. (1996), devido à possibilidade de esses produtos estarem contaminados com *L. monocytogenes*, o United States Department of Agriculture (USDA)/Food Safety and Inspection Service (FSIS) começou a testar e a monitorar produtos cárneos prontos para consumo e produtos à base de frango para detectar presença do patógeno. A partir da detecção da bactéria em qualquer um desses produtos, esse produto é considerado adulterado, sendo objeto de rejeição, de condenação ou de outra ação.

O protocolo do USDA/FSIS para isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos utiliza dois estágios de enriquecimento seletivo e pequenas porções do produto obtido de várias embalagens do alimento, como, por exemplo, embalagens de 456 g de salsichas (McCLAIN; LEE, 1988). Essas porções são combinadas para formar uma amostra de 25 g, a qual é triturada em meio de enriquecimento seletivo para *L. monocytogenes* de acordo com o protocolo aprovado pelo USDA/FSIS (COOK, 1999).

O objetivo deste estudo foi comparar a eficiência e a frequência do método de enriquecimento do USDA/FSIS com métodos alternativos de amostragem, como o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA Agricultural Research Service (ARS), o qual envolve a amostragem da parte externa do produto alimentício. Esses experimentos foram realizados utilizando-se salsichas inoculadas experimentalmente, assim como salsichas obtidas a varejo no mercado local.

## 3.5 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.5.1 Preparo das cepas

Foi utilizada uma mistura de cinco cepas de *Listeria monocytogenes* [Scott A (sorotipo 4b; isolado clínico (LINNAN et al., 1988)), H7776 [sorotipo 4b, isolado de salsichas (CDCP, 1998)], LM-101 M [sorotipo 4b; isolado de salame de carne bovina e suína (GLASS; DOYLE, 1989)], F6854 (sorotipo 1/2a, isolado de salsicha de carne de peru (SCHWARTZ et al., 1988), e MFS-2 (sorotipo 1/2a, isolado de planta de processamento de suínos, neste estudo), para inocular salsichas posteriormente embaladas e seladas a vácuo.

Aproximadamente 100 µl de cultura-estoque de cada cepa, mantidas a -20 °C em caldo infusão cérebro coração (BHI; Difco Laboratories Inc., Detroit, Michigan) adicionadas de 20% de glicerol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), foram semeadas por esgotamento em placas de BHI (Difco) contendo 1,5% de ágar, para confirmação da pureza das cepas. Uma colônia de cada cepa foi transferida e cultivada isoladamente em 50 ml de caldo BHI e incubada a 37 °C por 24 horas em agitação (100 r.p.m).

Ato contínuo, 100 µl de cada cultura foram transferidos isoladamente para 50 ml de caldo BHI e incubados em agitação a 37 °C por 18 horas adicionais. Células resultantes de cada cultura, em fase estacionária, foram diluídas separadamente em água peptonada a 0,1% (Bacto peptone; Difco). Em seguida, a mistura das cinco cepas foi obtida adicionando-se volumes iguais das cinco suspensões individuais. O nível inicial do inóculo de *L. monocytogenes* foi determinado por semeadura em superfície de 250 µl da mistura recém-preparada em placas de ágar Oxford modificado (COOK, 1999) e BHI. Após a incubação por 48 horas a 37 °C, colônias representativas de *L. monocytogenes* foram enumeradas e confirmadas.

Os testes de confirmação para *L. monocytogenes* foram coloração de Gram, motilidade (Bacto Motility Test Medium, Difco), reação de catalase em lâminas de vidro, hemólise em ágar BHI contendo 5% de sangue de carneiro e reatividade em

testes bioquímicos (API 10 300 Listeria Test, Bio Mérieux Laboratories, St. Louis, MO).

### **3.5.2 Preparo e inoculação das salsichas embaladas a vácuo**

Salsichas contendo carne suína e bovina, água, cloreto de sódio, condimentos, páprica, eritorbato de sódio e nitrito de sódio foram obtidas em uma planta de processamento em Philadelphia, PA, USA. As embalagens foram higienizadas com etanol a 70% e abertas com o auxílio de tesoura esterilizada. Oito salsichas (aproximadamente 56 g/salsicha) foram reembaladas em sacos de nylon-polietileno (barreira padrão 3 Mil; 20,3 x 30,5 cm;  $O_2 < 0,6 \text{ cm}^3/650 \text{ cm}^2$  por 24h a 0 °C umidade relativa com faixa de transmissão de umidade a vapor de 0,6 gramas de  $H_2O$  por  $650 \text{ cm}^2$  por 24 h a 38 °C; Koch Industries, Kansas City, MO). Cada embalagem foi inoculada com 4 ml da mistura de cinco cepas *L. monocytogenes*, diluída o necessário, em água peptonada a 0,1%, com um inóculo médio ( $n = 3$ ) inicial de 22 ou 20.133 UFC por embalagem, e as embalagens do tratamento-controle foram inoculadas com 4 ml de água peptonada a 0,1%, sendo ambas massageadas manualmente visando à distribuição do inóculo. As embalagens foram seladas a quente utilizando-se uma embaladora a vácuo Multivac A300/16 a 95 kPa (Sepp Haggemüller KG, Wolfertschwenden, Alemanha) e, posteriormente, incubadas a 4 °C por 48 horas antes do início da amostragem. O inóculo foi enumerado por semeadura em superfície da mistura das cinco cepas do patógeno ou diluições da mesma em ágar seletivo Oxford modificado (MOX) (COOK, 1999) utilizando-se um plaqueador espiral automático (Autoplate 4000, Spiral Biotech, Gaithersburg, MD). As placas de ágar MOX foram incubadas por 48 h a 37 °C, e as colônias, contadas manualmente.

### **3.5.3 Métodos de isolamento para *L. monocytogenes***

Para cada método de isolamento, foram utilizadas dez embalagens inoculadas com uma média ( $n = 3$ ) de 22 UFC e dez embalagens inoculadas com

uma média ( $n = 3$ ) de 20.133 UFC. As colônias foram contadas manualmente e confirmadas pelo método aprovado do USDA/FSIS (COOK, 1999). Colônias isoladas foram confirmadas como *L. monocytogenes* utilizando teste bioquímico API 10 300 (Listeria Test, Bio Mérieux Laboratories, St. Louis, MO), reação de oxidase (Remel, Lenexa, KA), reação de catalase,  $\beta$ -hemólise em ágar BHI contendo 5% de sangue de carneiro.

### **3.5.3.1 Métodos de isolamento para *L. monocytogenes*: método de enriquecimento do USDA/FSIS**

O protocolo padrão de isolamento do USDA/FSIS (COOK, 1999) foi realizado como descrito para a recuperação de *L. monocytogenes* em embalagens de salsichas. Resumidamente, foi retirada uma porção de  $5 \pm 0,1$  g de cinco salsichas escolhidas aleatoriamente, visando à obtenção de uma única amostra de 25 g. Para cada amostra, foram adicionados 225 ml de caldo de enriquecimento modificado University of Vermont (Oxoid Ltda., Hampshire, England), sendo a amostra triturada com o uso de triturador (modelo 400, A. J. Seward, London, UK) por 2 minutos e incubada por  $22 \pm 2$  h a 30 °C. Uma alíquota de 0,1 ml foi transferida de cada embalagem para tubos contendo 10 ml de caldo Fraser (Oxoid). Após 24 a 28 h de incubação a 37 °C, uma alíquota de 200  $\mu$ l do caldo Fraser foi semeada por esgotamento em ágar seletivo MOX. Seguido de 48 h de incubação a 37 °C, cada placa ágar seletivo MOX foi examinada visualmente para verificar a presença de colônias com morfologia típica de *L. monocytogenes* rodeadas por zonas escuras.

### **3.5.3.2 Métodos de isolamento para *L. monocytogenes*: método de enxágüe de amostra do USDA/ARS**

Para o método de enxágüe de amostra do USDA/ARS, amostras de 25 g do produto foram preparadas conforme descrito anteriormente, pelo método de enriquecimento do USDA/FSIS. Cada uma delas foi colocada em saco estéril de

nylon-polietileno contendo 25 ml de água peptonada a 0,1% e massageada manualmente por 2 minutos. O fluido resultante foi transferido para um tubo de centrifuga cônico estéril de 50 ml. O número de células de *L. monocytogenes* de cada embalagem foi enumerado por semeadura em superfície do fluido resultante ou diluições em ágar seletivo MOX utilizando um plaqueador espiral automático. Foram plaqueados um total de 10 ml do fluido resultante de embalagens inoculadas com uma média de 22 UFC, e um total de 5 ml do fluido resultante de embalagens inoculadas com uma média de 20.133 UFC.

### **3.5.3.3 Métodos de isolamento para *L. monocytogenes*: método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS**

Para o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS, cada embalagem foi aberta assepticamente e foram adicionados 21 ml de água peptonada a 0,1%, para um volume total de 25 ml. Cada embalagem foi massageada manualmente por 2 minutos e o fluido resultante foi transferido para um tubo de centrifuga cônico estéril de 50 ml. As células de *L. monocytogenes* isoladas de cada embalagem foram enumeradas por plaqueamento direto do fluido resultante ou diluições em ágar seletivo MOX através de plaqueador espiral automático. Um total de 7 ml do fluido resultante de embalagens inoculadas com uma média de 22 UFC e um total de 3 ml do fluido resultante de embalagens inoculadas com uma média de 20.133 UFC.

### **3.5.4 Análise de salsichas adquiridas a varejo**

Além do estudo com as embalagens inoculadas, salsichas adquiridas a varejo em três supermercados em Philadelphia/USA foram analisadas para a detecção de *L. monocytogenes* através dos três métodos de isolamento descritos. As salsichas foram adquiridas duas vezes em um intervalo de um mês, de maio a junho de 2000, somando 60 embalagens de 456 g de cinco marcas distintas (um total de 300

embalagens). Foram testadas 20 das 60 embalagens para cada um dos três métodos.

### **3.5.5 Ribotipagem**

*L. monocytogenes* isoladas de salsichas adquiridas no comércio local foram caracterizadas através do sistema automatizado Riboprinter™ de caracterização microbiana (Qualicon, Wilmington, Del.), usando a enzima de restrição *EcoRI* (Qualicon) de acordo com as recomendações do fabricante.

### **3.5.6 Análises estatísticas**

Os dados obtidos de três repetições foram analisados pelo SAS versão 8.0 (SAS Institute, Inc., Cary, N. C.). Foi realizada uma análise estatística de qui-quadrado para comparar a frequência (porcentagem de embalagens com resultado positivo para *L. monocytogenes*) e eficiência (porcentagem de isolamento de *L. monocytogenes* das embalagens) do método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS com os métodos de enxágüe de amostra do USDA/ARS e de enriquecimento de amostra do USDA/FSIS.

## **3.6 RESULTADOS**

### **3.6.1 Recuperação de *L. monocytogenes* de embalagens de salsichas inoculadas**

*L. monocytogenes* foi recuperada de embalagens inoculadas com uma média de 22 UFC da mistura do patógeno por embalagem, a uma frequência de 100% (com 30 de 30 embalagens com resultado positivo para o patógeno), com o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS. O patógeno foi isolado em uma frequência de 10% (com 3 de 30 embalagens com resultado positivo para o

patógeno) para o método de enxágüe de amostra do USDA/ARS e uma frequência de 17% (com 5 de 30 embalagens testadas positivas) para método de enriquecimento do USDA/FSIS (Tabela 1). A presença de *L. monocytogenes* foi observada nos três métodos de isolamento para todas as 30 embalagens que foram inoculadas com uma média de 20.133 UFC por embalagem.

A eficiência foi determinada para os métodos de enxágüe de amostra do USDA/ARS e de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS. Para o método de enriquecimento do USDA/FSIS a eficiência não foi determinada em razão desse procedimento ser um método qualitativo.

O método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS recuperou uma média de 95% (21 de 22 UFC) do patógeno inoculado em cada uma das 30 embalagens, enquanto o método de enxágüe de amostra do USDA/ARS recuperou uma média de 20% (4,5 de 22 UFC) (Tabela 1). Em embalagens inoculadas com alto inóculo inicial, o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS recuperou uma média de 94% (18.975 de 20.133 UFC) do patógeno inoculado em cada uma das embalagens, comparado com uma média de 43% (8.671 de 20.133) com o método de enxágüe de amostra do USDA/ARS.

Quando embalagens inoculadas com baixo inóculo inicial foram analisadas pelo método de enxágüe de amostra do USDA/ARS, 0,25% (3 de 1.200) das placas de ágar seletivo MOX apresentaram colônias de *L. monocytogenes*, enquanto, com o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS, 21% (180 de 240) apresentaram colônias do patógeno (Tabela 1). Em embalagens inoculadas com alto inóculo inicial, 98% (586 de 600) de placas de ágar seletivo MOX apresentaram colônias de *L. monocytogenes* quando analisadas pelo método de enxágüe de amostra do USDA/ARS, enquanto 100% (360 de 360 placas) apresentaram colônias de *L. monocytogenes* com o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS.

Tabela 1. Isolamento de *L. monocytogenes* de embalagens de salsichas.

Método de isolamento	Frequência (% de embalagens positivas) <sup>a</sup>	Eficiência (% de isolamento das embalagens) <sup>b</sup>	Isolamento (% de placas Mox positiva) <sup>c</sup>
Baixo inóculo (22 UFC/embalagem) <sup>d</sup>			
Enriquecimento do USDA/FSIS	17 (5/30)	NA <sup>e</sup>	NA
Enxágüe de amostra do USDA/ARS	10 (3/30)	20 (4.5/22)	0.25 (3/1.200)
Enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS	100 (30/30)	95 (21/22)	21(180/240)
Alto inóculo (20.133 UFC/embalagem) <sup>d</sup>			
Enriquecimento do USDA/FSIS	100 (30/30)	NA	NA
Enxágüe de amostra do USDA/ARS	100 (30/30)	43 (8.671/20.133)	98 (586/600)
Enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS	100 (30/30)	94 (18.975/20.133)	100 (360/360)

<sup>a</sup> Número de embalagens positivas/número de embalagens testadas mostrado entre parênteses.

<sup>b</sup> UFC isoladas/UFC inoculadas mostradas entre parênteses.

<sup>c</sup> Número de placas positivas/número total de placas mostrado entre parênteses.

<sup>d</sup> Representa uma média de três repetições.

<sup>e</sup> NA, não aplicável, devido ao método de enriquecimento de amostra do USDA/FSIS ser um método qualitativo.

A análise estatística dos dados mostrou que o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS foi significativamente mais eficiente ( $P < 0,0001$ ) na recuperação de *L. monocytogenes* de embalagens inoculadas com uma média de 22 ou 20.133 UFC quando comparado com o método de enxágüe de amostra do USDA/ARS. A eficiência da recuperação do método de enriquecimento do USDA/FSIS não pode ser determinada devido ao método ser qualitativo. Para embalagens inoculadas com uma média de 22 UFC, o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS foi consideravelmente mais eficiente ( $P < 0,005$ ) para identificação de embalagens contendo *L. monocytogenes* do que os dois outros métodos testados. Não houve diferença significativa entre os três métodos de isolamento em relação ao isolamento do patógeno em embalagens inoculadas com uma média de 20.133; os três métodos comprovaram que todas as 30 embalagens continham *L. monocytogenes*.

### 3.6.2 Isolamento de *L. monocytogenes* de embalagens de salsichas adquiridas a varejo

Para validar a eficiência dos três métodos de isolamento, 60 embalagens de salsichas de 456 g de cinco diferentes marcas (um total de 300 embalagens) foram adquiridas no mercado local e testadas para presença ou ausência de *L. monocytogenes*. Cada um dos três métodos foi avaliado em relação à capacidade de isolar *L. monocytogenes* em 20 das 60 embalagens de cada marca. Sessenta embalagens de quatro marcas foram negativas para os três métodos de isolamento. Em contraste, duas das 20 embalagens da quinta marca testada foram positivas quando analisadas pelo método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS. O restante das 40 embalagens da quinta marca apresentaram resultados negativos para o patógeno pelos outros dois métodos utilizados. Análises subseqüentes de ribotipagem, com digestão do cromossomo com enzima de restrição *EcoI*, mostraram que cepas de *L. monocytogenes* isoladas de cada uma das duas embalagens que foram positivas apresentaram perfil genético indistinguível, ribotipo DUP-1039, sugerindo uma fonte de contaminação comum.

## 3.7 DISCUSSÃO

A maioria das inspeções de alimentos para *L. monocytogenes* dependem dos métodos aprovados do USDA/FSIS e/ou do Food Drug Administration (FDA), os quais determinam a presença ou ausência de *L. monocytogenes* em um alimento, mas não os números do patógeno (RYSER; MARTH, 1999). Teoricamente, o limite de detecção do método de USDA/FSIS é  $\leq 1$  UFC por 25 g da amostra. Para amostragem de rotina em salsichas, este valor é extrapolado para 0,04 UFC/g, ou aproximadamente 18 UFC por embalagem de 456 g. Dada a dificuldade de obtenção da composição das amostras e o fato de que um lote pode apresentar resultado negativo, embora possa hospedar uma população do patógeno  $\leq 18$  UFC por embalagem, estudos adicionais têm sido demandados para avaliar métodos de isolamento mais simples ou sensíveis.

Dos três métodos de isolamento avaliados no presente estudo, o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS foi aproximadamente seis vezes mais eficaz do que o método de enriquecimento do USDA/FSIS e aproximadamente dez vezes mais eficaz que o método de enxágüe de amostra do USDA/ARS para detectar embalagens inoculadas com uma média inicial de 22 UFC como positiva para *L. monocytogenes*. O método de enxágüe do produto na embalagem também foi aproximadamente cinco vezes mais eficaz para enumerar *L. monocytogenes* em embalagens inoculadas com 22 UFC e duas vezes para as inoculadas com 20.133 UFC. Além disso, o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS foi o único que detectou a presença do patógeno em uma das cinco marcas de salsichas testadas e adquiridas a varejo no mercado local. Em relação a isso, a incidência de *L. monocytogenes* em embalagens a varejo foi estimada em 20% (1 de 5 marcas), 10% (2 de 20 embalagens da quinta marca testada pelo método de enxágüe do produto na embalagem), 3,3% (2 de 60 embalagens testadas com os três métodos *L. monocytogenes*), 2% (2 de 100 embalagens [5 marcas, 20 embalagens cada] testadas pelo método de enxágüe do produto na embalagem), ou 0,33% (2 de 300 embalagens de todas as cinco marcas e todos os três métodos), dependendo de como os dados sejam reportados. Esses resultados estão de acordo com aqueles publicados em outras pesquisas. Por exemplo, Wang e Muriana (1994) relataram que 7 de 93 (8%) embalagens de salsichas, representadas por 19 marcas, foram positivas para *L. monocytogenes*, e Tiwari e Aldenrath (1990) relataram uma incidência de 13% a 21% do patógeno em salsichas e carnes fatiadas. Os resultados do presente estudo sugerem que a incidência seria um pouco maior se o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS fosse empregado em rotinas de amostragem para o patógeno.

A principal vantagem do método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS é que o método diminui a manipulação do alimento, a qual reduz uma provável contaminação do produto e diminui o tempo de amostragem. O método também permite a amostragem de uma variedade de produtos pronto para consumo contaminados na superfície, como peru inteiro, frango e carnes de *delicatessen*. Além disso, devido ao produto e ao exudato serem enxaguados, qualquer exudato associado com o produto será analisado. Logo, tal método é uma ferramenta de

amostragem útil para estudos nos quais grandes volumes de alimentos podem vir a ser contaminados na superfície com *L. monocytogenes*.

Em resumo, o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS foi mais eficaz do que o método aprovado de enriquecimento do USDA/FSIS em isolar *L. monocytogenes* de embalagens de salsichas. Estão sendo realizados estudos para estabelecer o limite de detecção desse método, avaliar a performance do método em um grande número de amostras, investigar a forma de contaminação, verificar a aderência da bactéria na superfície do produto e, posteriormente, validar o método com produtos naturalmente contaminados. Devido à sua facilidade de uso e eficácia na detecção de *L. monocytogenes*, o método de enxágüe do produto na embalagem do USDA/ARS permitirá a indústrias de alimentos e agências do governo avaliar o risco de uma contaminação superficial de alimentos prontos para consumo com *L. monocytogenes* de forma mais segura.

#### AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a James Lindsay (USDA-ARS Beltsville, MD), Alan Oser e Lisa Yoder (Hatfield Quality Meats, Hatfield, PA), Walter Hill, Karen Hulebak, Priscila Levine, Gerri Ransom e Kaye Wachsmuth (USDA/FSIS, Washington, D.C.) e a Daisy Bougard, Chris Cifelli, Benne Marmer, John Phillips, Jenny Romano, Anne Vidy e Julie Wade (USDA/ARS/ERRC, Wyndmoor, PA). As consultas e assistência técnica oferecidas por eles foram essenciais para a condução deste estudo.

### 3.8 REFERÊNCIAS

1. COOK, L. V. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg, and environmental samples. Chapter 8, In: **USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook**. 3. ed., Revision 2, 1999.
2. FARBER, J. M.; PERTERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 476-521, 1991.
3. GILLESPIE, I.; LITTLE, C.; MITCHELL, R. Microbiological examination of cold ready-to-eat sliced meats from catering establishments in the United Kingdom. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 467-474, 2000.

4. MCCLAIN, D.; LEE, W. H. Development of USDA/FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 71, p. 660-664, 1988.
5. PORTO, A. C. S.; FRANCO, B. D. G. M.; SANT'ANNA, E. S.; CALL, J. E.; PIVA, A.; LUCHANSKY, J. B. Viability of a five-strain mixture of *Listeria monocytogenes* in vacuum-sealed packages of frankfurters, commercially prepared with and without 2.0 and 3.0% added potassium lactate, during extended storage at 4 and 10°C. **J. Food Protect.**, v. 65, p. 308-315, 2002.
6. RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1999.
7. SHANK, F. R.; ELLIOT, E. L.; WACHSMUTH, I. K.; LOSIKOFF, M. E. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Control**, v. 7, p. 229-234, 1996.
8. TIWARI, N. P.; ALDENRATH, S. G. Occurrence of *Listeria* species in food and environmental samples in Alberta. **Can. Inst. Food Sci. Technol. J.**, v. 22, p. 109-113, 1990.
9. WALLACE, F. M., III; PORTO, A. C. S.; CALL, J. E.; LUCHANSKY, J. B. Comparison of the approved USDA/FSIS product compositing method and the USDA-ARS package rinsing method for the recovery of *Listeria monocytogenes* from frankfurters. Abstr. 59F-30, p. 149. **IFT Annu. Meet. Book of Abstracts**, 2001. Annu. Meet. Institute of Food Technologists, New Orleans, LA.
10. WANG, C.; MURIANA, P. M. Incidence of *Listeria monocytogenes* in packages of retail franks. **J. Food Protect.**, v. 57, p. 382-386, 1994.

## 4      CAPÍTULO II

**SOBREVIVÊNCIA DE UMA MISTURA DE CINCO CEPAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM SALSICHAS EMBALADAS A VÁCUO, COM E SEM A ADIÇÃO DE 2,0% OU 3,0% DE LACTATO DE POTÁSSIO DURANTE VIDA DE PRATELEIRA A 4 °C E 10 °C**

#### 4.1 TÍTULO

Viability of a five-strain mixture of *Listeria monocytogenes* in vacuum-sealed packages of frankfurters, commercially prepared with and without 2.0 or 3.0% added potassium lactate, during extended storage at 4 °C e 10 °C\*.

PORTO, A. C. S.; FRANCO, B. D. G. M.; SANT'ANNA, E. S.; CALL, J. E.; PIVA, A.; LUCHANSKY, J. B. **Journal Food Protection**, v. 65, n. 2, p. 308-315, 2002.

\*Trabalho parcial apresentado no Annual Meeting do Institute of Food Technologists, New Orleans, Louisiana, USA, June 23-28, 2001 (PORTO et al., 2001).

## 4.2 RESUMO

O presente estudo monitorou a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em salsichas contendo lactato de potássio adicionado à formulação, obtidas diretamente de um produtor comercial. Oito salsichas (com aproximadamente 56 g cada) foram transferidas assepticamente das embalagens a vácuo para sacos de nylon-polietileno. Salsichas contendo 2,0% ou 3,0% de lactato de potássio foram inoculadas com 20 UFC por embalagem, e salsichas contendo 3,0% de lactato de potássio foram inoculadas com 500 UFC por embalagem. As embalagens foram fechadas a vácuo e estocadas a 4 ou 10 °C por 90 ou 60 dias, respectivamente. Durante a estocagem a 4 °C, os números do patógeno permaneceram aproximadamente 1,6 log<sub>10</sub> UFC por embalagem durante 90 dias em embalagens contendo salsichas formuladas com a adição de 2,0% de lactato de potássio inoculadas com cerca de 20 UFC. Em embalagens contendo salsichas formuladas com 3,0% de lactato de potássio inoculadas com cerca de 20 UFC e estocadas a 4 °C, os números do patógeno permaneceram aproximadamente 1,4 log<sub>10</sub> UFC por embalagem durante 90 dias. Em embalagens contendo salsichas formuladas com 3,0% de lactato de potássio, inoculadas com cerca de 500 UFC e estocadas a 4 °C, os números do patógeno permaneceram aproximadamente 2,4 log<sub>10</sub> UFC por embalagem durante 90 dias. Entretanto, na ausência da adição de lactato de potássio, os números do patógeno aumentaram para 4,6 e 5,0 log<sub>10</sub> UFC por embalagem após 90 dias de estocagem para salsichas com inóculo inicial de 20 e 500 UFC por embalagem, respectivamente. Durante estocagem a 10 °C, os números do patógeno permaneceram aproximadamente em 1,4 log<sub>10</sub> UFC por embalagem durante 60 dias em embalagens contendo salsichas formuladas com a adição de 2,0% de lactato de potássio inoculadas com cerca de 20 UFC. Em embalagens contendo salsichas formuladas com adição de 3,0% de lactato de potássio, inoculadas com cerca de 20 UFC e estocadas a 10 °C, os números do patógeno permaneceram aproximadamente 1,1 log<sub>10</sub> UFC por embalagem durante 60 dias. Na ausência da adição de lactato de potássio, os números do patógeno aumentaram para 6,5 log<sub>10</sub> UFC após 28 dias, e diminuíram para 5,0 log<sub>10</sub> UFC por embalagem após 60 dias de estocagem a 10 °C. Em embalagens contendo salsichas formuladas com adição de 3,0% de lactato de potássio, inoculadas com cerca de 500 UFC por embalagem, os números do patógeno permaneceram aproximadamente em 2,4 log<sub>10</sub> UFC por embalagem durante 60 dias de estocagem a 10 °C, enquanto na ausência de lactato de potássio os números do patógeno aumentaram para 6,6 log<sub>10</sub> UFC após 40 dias, e diminuíram para 5,5 log<sub>10</sub> UFC por embalagem após 60 dias de estocagem. A sobrevivência de *L. monocytogenes* em salsichas estocadas a 4 ou 10 °C foi influenciada pelo pH e pela presença ou concentração de lactato, mas não pela presença ou pela população de bactérias lácticas naturais ou pela composição centesimal do produto. Esses dados estabeleceram que a adição de 2,0% ( $P < 0,0004$ ) ou 3,0% ( $P < 0,0001$ ) de lactato de potássio como um ingrediente na produção de salsichas pode assegurar a qualidade microbiológica do produto ao inibir ou retardar a multiplicação de *L. monocytogenes* durante estocagem em temperatura de refrigeração ou abusiva.

**Palavras-chave:** *L. monocytogenes*, salsichas, lactato de potássio, carne.

### 4.3 ABSTRACT

The viability of *Listeria monocytogenes* was monitored on frankfurters added potassium lactate that were obtained directly from a commercial manufacturer. Eight links (ca. 56 g each) were transferred aseptically from the original vacuum-sealed bulk packages into nylon/polyethylene bags. Each bag then received a 4-ml portion of a five-strain mixture of the pathogen. Frankfurters containing 2.0 or 3.0% potassium lactate were evaluated using 20 CFU per package, and frankfurters containing 3.0% potassium lactate were evaluated using 500 CFU per package. The packages were vacuum-sealed and stored at 4 or 10 °C for up to 90 or 60 days, respectively. During storage at 4 °C, pathogens numbers remained at about 1.6 log<sub>10</sub> CFU per package over 90 days in packages containing frankfurters with 2.0% potassium lactate that were inoculated with about 20 CFU. In packages containing frankfurters with 3.0% potassium lactate that were inoculated with 20 CFU and stored at 4 °C, pathogens numbers remained at about 1.4 log<sub>10</sub> CFU per package over 90 days. In packages containing frankfurters with 3.0% potassium lactate that were inoculated with 500 CFU and stored at 4 °C, pathogens numbers remained at about 2.4 log<sub>10</sub> CFU per package over 90 days. However, in the absence of any potassium lactate, pathogens number increased to 4.6 and 5.0 log<sub>10</sub> CFU per package after 90 days of storage at 4 °C for starting levels of 20 and 500 CFU per package, respectively. During storage 10 °C, pathogens numbers remained at about 1.4 log<sub>10</sub> CFU per package over 60 days in packages containing frankfurters with 2.0% potassium lactate that were inoculated with about 20 CFU. In packages containing frankfurters with 3.0% potassium lactate that were inoculated with 20 CFU and stored at 10 °C, pathogens numbers remained at about 1.1 log<sub>10</sub> CFU per package over 60 days. In the absence of any potassium lactate, pathogens number increased to 6.5 log<sub>10</sub> CFU per package after 28 days and then declined to 5.0 log<sub>10</sub> CFU per package after 60 days of storage at 10 °C. In packages containing frankfurters with 3.0% potassium lactate that were inoculated with 500 CFU per package, pathogen numbers remained at about 2.4 log<sub>10</sub> CFU per package over 60 days at 10 °C, whereas in the absence of any potassium lactate, pathogen numbers increased to about 6.6 log<sub>10</sub> CFU per package within 40 days and then declined to about 5.5 log<sub>10</sub> per package after 60 days of storage at 10 °C. The viability of *L. monocytogenes* in frankfurter packages stored at 4° and 10°C was influenced by the pH and the presence or levels of lactate, but not by presence or levels of indigenous lactic acid bacteria or by proximate composition of the product. These data establish that the addition of 2.0% ( $P < 0.0004$ ) or 3.0% ( $P < 0.0001$ ) potassium lactate as an ingredient in frankfurters can appreciably enhance safety by inhibiting or delaying growth of *L. monocytogenes* during storage at refrigeration and abuse temperatures.

**Key words:** *L. monocytogenes*, frankfurters, potassium lactate, meat.

#### 4.4 INTRODUÇÃO

Apesar de a maioria dos casos de listeriose nos Estados Unidos serem isolados (SCHUCHAT et al., 1992), ocorreram pelo menos quatro surtos bem documentados: i) o surto da Califórnia, em 1985, associado a um sorotipo 4b em queijo do tipo mexicano (142 casos, 48 mortes) (LINNAN et al., 1988); ii) o surto de Wiscosin, Illinois, Michigan (7 casos invasivos, típicos, nenhuma morte) (PROCTOR et al., 1995) e Illinois (45 casos não invasivos, atípicos, nenhuma morte) (DALTON et al., 1997) em 1994, associado ao sorotipo 1/2b em leite achocolatado; iii) o surto interestadual entre 1998 e 1999, associado ao sorotipo 4b isolado de salsichas e produtos cárneos de *delicatessen* (101 casos, 21 mortes) (CDCP, 1998); e iv) o surto interestadual em 2000, associado ao sorotipo 1/2a em produto cárneo de peru pronto para consumo (29 casos, 4 mortes, 3 abortos ou natimortos) (CDCP, 2000). Particularmente, os dois últimos surtos de listeriose impulsionaram o debate sobre o aspecto regulatório de “tolerância zero” para *L. monocytogenes* nos Estados Unidos, assim como pesquisas no desenvolvimento de estratégias de intervenção pós-processamento para produtos prontos para consumo.

Recentes dados do Centers for Disease Control and Prevention (CDCP) indicam a ocorrência de 2493 casos da doença e 499 mortes nos Estados Unidos devido à listeriose (MEAD et al., 1999). Além disso, os números e a importância de *recalls* de alimentos devido à contaminação com *L. monocytogenes* aumentaram drasticamente nos últimos anos (ANÔNIMO, 1996). Somente em 1999, o United States Department of Agriculture (USDA)/Food Safety and Inspection Service (FSIS) determinou 62 *recalls* de carnes cozidas, sendo 31 em razão da presença de *L. monocytogenes* (FSIS/USDA, 2001). Entretanto, pouca informação está disponível em relação a fontes e níveis de contaminação em alimentos prontos para consumo, incluindo salsichas, que, se contaminadas, pode ser provável causa da doença.

Porém, esse fato é importante já que a incidência de listeriose é similar em países como a Alemanha (aproximadamente três casos por milhão de habitantes), que tem estabelecido níveis de tolerância para *L. monocytogenes*, e países como os Estados Unidos (aproximadamente quatro a cinco casos por milhão de habitantes),

que mantêm estratégia de tolerância zero para esse patógeno (BUCHANAN et al., 1997).

*L. monocytogenes* é comumente encontrada no meio ambiente, assim como em alimentos, plantas de processamento de alimentos e estabelecimentos para preparo de alimentos (FARBER; PEREKIN, 1991; GILLESPIE et al., 2000; RYSER; MARTH, 1999). Em produtos cárneos, a incidência dessa bactéria pode ser tão baixa quanto 3%, assim como tão elevada quanto 90% (JOHNSON et al., 1990), com uma estimativa média de 16% (JAY, 1996). Quando presente, os números da bactéria variam de <10 a 1.000 UFC por grama (BUCHANAN et al., 1989; JOHNSON et al., 1990), entretanto números do patógeno de  $\geq 10^2$  UFC por grama têm sido observados para patê e alguns produtos cárneos fatiados (MORRIS; RIBEIRO, 1989; NORRUNG et al., 1999; VELONI; GILBERT, 1990).

Qvist e Liberski (1991), verificando a presença de *L. monocytogenes* em salsichas, observaram que 6% das amostras foram positivas durante empacotamento, e 13% ao término da vida de prateleira quando estocadas de 8 a 10 °C. Wang e Muriana (1994) relataram que 7 de 93 (8%) embalagens de 19 marcas de salsichas apresentaram resultados positivos para *L. monocytogenes*. Em outro estudo, Tiwari e Aldenrath (1990) relataram a incidência de 13% a 21% de *L. monocytogenes* em salsichas e carnes fatiadas, e Bersot et al. (2001) relataram que 8 de 30 (27%) amostras testadas de mortadela foram positivas para *L. monocytogenes*. Finalmente, Hudson et al. (1992) conduziram um estudo com 203 produtos cárneos prontos para consumo no mercado a varejo na Nova Zelândia. Os resultados mostraram uma incidência de 6% (9 de 149 amostras) em produtos cozidos, 10% (2 de 20 amostras) em produtos cárneos fermentados, e 42% (13 de 31 amostras) em produtos defumados. O patógeno apresentou uma maior incidência em produtos pré-embalados (19%; 13 de 70 amostras) do que em produtos do tipo *delicatessen* (8%; 11 de 133 amostras). Esses dados validam a freqüente associação de *L. monocytogenes* com uma variedade de produtos cárneos prontos para consumo.

Vários pesquisadores têm estudado a capacidade de alguns produtos cárneos permitirem a multiplicação ou sobrevivência de *L. monocytogenes*. McKellar et al.

(1994), em seus estudos, observaram que aproximadamente 66% (40 de 61 amostras) de salsichas escolhidas em mercados a varejo suportaram a multiplicação dessa bactéria. Outros pesquisadores também relataram que *Listeriae* pode sobreviver ou multiplicar-se em uma variedade de produtos cárneos prontos para consumo, incluindo salsichas embaladas a vácuo ou exudatos derivados desses produtos, sob determinadas condições (BUNCIC et al., 1991; GLASS; DOYLE, 1989; VELANI; GILBERT, 1990; YOUSEF et al., 1991). Entretanto, a maioria dos estudos com produtos inoculados com *L. monocytogenes* tem utilizado um inóculo inicial com números relativamente altos ( $>10^{3-4}$  UFC por g) e/ou somente utilizando uma cepa de *L. monocytogenes*. Além disso, estudos anteriores dedicaram pouca atenção à influência da formulação do produto na sobrevivência e multiplicação do patógeno. O objetivo do presente trabalho foi verificar a sobrevivência de uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes* em salsichas embaladas a vácuo preparadas comercialmente com ou sem adição de lactato de potássio durante estocagem prolongada, à temperatura de refrigeração e abusiva.

## **4.5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.5.1 Preparo das cepas**

Foi utilizada uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes*, que foram confirmadas e mantidas como descrito anteriormente (item 3.5.1). Uma colônia de cada cepa foi transferida e cultivada independentemente em 50 ml de caldo infusão cérebro coração (BHI; Difco Laboratories Inc., Detroit, Michigan) e incubada a 37 °C por 24 horas em agitação (100 r.p.m). Em seguida, 100 µl de cada cultura foram transferidos isoladamente para 50 ml de caldo BHI e incubados a 37 °C por 18 horas adicionais em agitação. Células resultantes de cada cultura, em fase estacionária, foram diluídas separadamente em água peptonada a 0,1% (Bacto peptone; Difco). A mistura das cepas foi obtida misturando-se volumes iguais das cinco suspensões individuais.

#### 4.5.2. Preparo e inoculação das salsichas embaladas a vácuo

Salsichas de carne suína e bovina sem pele (aproximadamente 56 g/salsicha) embaladas a vácuo (aproximadamente 456 g/pacote) foram obtidas em uma planta de processamento em Philadelphia, PA, USA. As salsichas foram preparadas com carnes suína e bovina, água, cloreto de sódio, condimentos, páprica, eritorbato de sódio e nitrito de sódio. Foram testadas duas formulações; uma contendo uma concentração final de 2,0% ou 3,0% de lactato de potássio adicionado na emulsão (Purac America, Inc., Lincolnshire, IL) e outra não contendo esse aditivo.

As salsichas foram removidas assepticamente da embalagem original e reembaladas (8 salsichas por embalagem) em sacos de nylon-polietileno (barreira-padrão 3 Mil; 20,3 x 30,5 cm;  $O_2 < 0,6 \text{ cm}^3/645 \text{ cm}^2/\text{por } 24 \text{ h a } 0 \text{ }^\circ\text{C}$ , umidade relativa com faixa de transmissão de umidade a vapor de 0,6 gramas de  $H_2O$  por  $645 \text{ cm}^2$  por 24 h a  $38 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Koch Industries, Kansas City, MO). Cada embalagem foi inoculada com 4 ml da suspensão da mistura de cinco cepas *L. monocytogenes*, diluída o necessário, em água peptonada a 0,1%, para atingir um inóculo inicial de aproximadamente 20 ou 500 UFC por embalagem.

As embalagens do tratamento-controle foram inoculadas com 4 ml de água peptonada a 0,1%. Em seguida, as embalagens foram massageadas manualmente por dois minutos visando à distribuição do inóculo, seladas utilizando-se uma embaladora a vácuo Multivac A300/16 a 95 kPa (Sepp Haggemüller KG, Wolfertschwenden, Alemanha) e incubadas a 4 e 10 °C. Os tratamentos estocados a 4 °C foram analisados após 0, 7, 15, 21, 28, 60 e 90 dias, e os tratamentos estocados a 10 °C, analisados após 0, 5, 8, 11, 21, 28, 40 e 60 dias. O tratamento-controle foi analisado após 0, 28, e 90 dias a 4 °C, e nos dias 0, 28 e 60 para as amostras estocadas a 10 °C. Foram conduzidas pelo menos duas repetições para cada tratamento e, a cada repetição, analisaram-se três embalagens por intervalo de amostragem.

### 4.5.3 Análises microbiológicas

A superfície externa da embalagem foi higienizada com papel toalha embebido em etanol 70% (v/v) e aberta assepticamente com o uso de tesoura esterilizada. Foram adicionados 16 ml de água peptonada a 0,1%, e a parte superior da embalagem foi dobrada. As embalagens foram massageadas manualmente por dois minutos, e o fluido resultante (aproximadamente 20 ml) foi transferido assepticamente para um tubo de centrífuga de 50 ml estéril com o auxílio de uma pipeta.

O patógeno foi enumerado por semeadura em superfície, inoculando 250 µl do fluido resultante ou diluições em placas de ágar Oxford modificado e incubadas por 48 h a 37 °C. Foram enumeradas colônias típicas de *Listeriae*, com 1-2 mm de circunferência, rodeadas por zonas escuras devido à hidrólise de esculina. Colônias representativas foram confirmadas como *L. monocytogenes*, como descrito anteriormente, e retidas em caldo BHI adicionado de 20% de glicerol para análises posteriores.

Bactérias lácticas (BAL) foram enumeradas por semeadura em superfície inoculando 250 µl do fluido resultante em placas de ágar Rogosa SL (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e incubadas anaerobicamente (10,1% de dióxido de carbono, 4,38% de hidrogênio e balanceada com nitrogênio; Bactron IV Anaerobic/Environmental Chamber, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR) por 48 h a 37 °C. As colônias foram contadas, e algumas, selecionadas aleatoriamente, foram congeladas a -70 °C, em caldo MRS (Man, Rogosa e Sharp, Oxoid Ltd., Hampshire, England) adicionado de 20% de glicerol (Sigma), para futuras análises. A contagem foi expressa em log<sub>10</sub> unidades formadoras de colônia (UFC) por embalagem.

#### 4.5.4 Análises físico-químicas

O pH do fluido obtido do enxágüe das salsichas de cada embalagem foi determinado pela combinação de um eletrodo (Corning model 3-in-1; Corning Inc., Corning, NY) com peagômetro (340 Meter; Corning Inc., Corning, NY). A composição centesimal das salsichas foi determinada de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (McNEAL, 1990) conduzida por um laboratório de análises comercial. As análises foram realizadas em duas amostras de uma repetição no dia zero.

#### 4.5.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo SAS versão 8.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Foi realizada uma análise de covariância para avaliar os efeitos e interações da formulação, temperatura e nível de inóculo na regressão de *L. monocytogenes* em relação ao tempo. Os resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3 são médias aritméticas  $\pm$  desvios padrão. Alguns desvios padrão foram maiores do que as médias devido à contagem do patógeno em uma das repetições estar abaixo do limiar de detecção. Neste caso, um valor zero foi atribuído para a determinação da média aritmética.

### 4.6 RESULTADOS

#### 4.6.1 Isolamento de *L. monocytogenes* e bactéria lácticas das embalagens de salsichas

Estudos preliminares foram realizados para comparar diferentes métodos de amostragem para o isolamento de números relativamente baixos (aproximadamente 20 UFC por embalagem) de *L. monocytogenes* de salsichas embaladas a vácuo. Foi comparado o método aprovado de enriquecimento do USDA/FSIS, no qual uma

amostra de 25 g é primeiro enriquecida e, então, uma alíquota semeada em superfície em ágar seletivo (COOK, 1999) com o método de enxágüe do produto do USDA/Agricultural Research Service (ARS), no qual 25 ml do fluido resultante da embalagem e seu conteúdo são diretamente semeadas em ágar seletivo (WALLACE et al., 2001). Através desses métodos, *L. monocytogenes* foi isolada em uma frequência (porcentagem de embalagens com resultado positivos para *L. monocytogenes*) de 17% e 100% para os métodos de enriquecimento do USDA/FSIS e para o método de enxágüe de amostra do USDA/ARS, respectivamente. O método de enxágüe de amostra do USDA/ARS apresentou uma eficiência (percentual de isolamento dos níveis iniciais de *L. monocytogenes*) de 95%. O método aprovado de enriquecimento do USDA/FSIS é somente um método qualitativo. Baseado nesses dados, o método de enxágüe de amostra do USDA/ARS foi utilizado neste estudo para recuperação de *L. monocytogenes* e bactérias lácticas de salsichas embaladas a vácuo.

#### **4.6.2 População da microbiota natural, valores de pH e composição centesimal do fluido e/ou das salsichas.**

Embalagens do produto adquiridas na planta de processamento que não foram inoculadas com o patógeno apresentaram ausência de *L. monocytogenes* (< 5 UFC por embalagem) através de plaqueamento direto. Amostragem representativa das embalagens revelou que a população de bactérias lácticas e os valores de pH variaram entre as formulações testadas e lotes (Tabelas 2 e 3). Em geral, a população de bactérias lácticas aumentou e os valores de pH diminuíram durante o período de estocagem em ambas as temperaturas testadas. Para salsichas formuladas com 2% de lactato de potássio, inoculadas com aproximadamente 20 UFC por embalagem, a população de bactérias lácticas aumentou 4,7 log<sub>10</sub> UFC por embalagem durante 90 dias a 4 °C, enquanto a população de bactérias lácticas aumentou 10,5 log<sub>10</sub> UFC por embalagem durante 60 dias a 10 °C (Tabela 3). Em salsichas formuladas com 3% de lactato de potássio, inoculadas com aproximadamente 20 UFC por embalagem, a população de bactérias lácticas

aumentou 10,0  $\log_{10}$  UFC por embalagem durante 90 dias a 4 °C, enquanto aumentou 9,4  $\log_{10}$  UFC por embalagem durante 60 dias a 10 °C.

Na ausência da adição de lactato de potássio, a população de bactérias lácticas aumentou 5,0 e 8,9  $\log_{10}$  UFC por embalagem durante estocagem a 4 e 10 °C, respectivamente. Para salsichas formuladas com 3% de lactato de potássio, inoculadas com aproximadamente 500 UFC por embalagem, a população de bactérias lácticas aumentou 10,4  $\log_{10}$  UFC por embalagem durante 90 dias a 4 °C, sendo observado um aumento de 9,4  $\log_{10}$  UFC por embalagem durante 60 dias a 10 °C. Na ausência da adição de lactato de potássio, a população de bactérias ácido lácticas aumentou 8,3 e 9,8  $\log_{10}$  UFC por embalagem durante estocagem a 4 e 10 °C, respectivamente. A adição de lactato de potássio na formulação do produto pode ter causado um decréscimo nos números e/ou tipos específicos da microbiota competitiva, permitindo que bactérias lácticas pudessem alcançar maior população em embalagens de salsichas formuladas com lactato de potássio do que aquelas formuladas sem a adição desse aditivo no produto. Apesar de os valores iniciais de pH terem tido uma pequena variação entre as formulações e lotes, os valores finais de pH não variaram, quando seguidos de estocagem em ambas as temperaturas testadas.

TABELA 2. Contagem de bactéria lácticas (BAL) ( $\log_{10}$  UFC por embalagem) e valores de pH em embalagens de salsichas estocadas a 4 °C por 90 dias.

Dias	0,0% lactato de potássio				2,0% lactato de potássio		3,0% lactato de potássio			
	20 UFC <sup>a</sup>		500 UFC <sup>b</sup>		20 UFC <sup>c</sup>		20 UFC <sup>b</sup>		500 UFC <sup>b</sup>	
	BAL	pH	BAL	pH	BAL	pH	BAL	pH	BAL	pH
0	2,56 ± 1,23	5,85 ± 0,49	3,91 ± 0,96	5,54 ± 0,70	2,28 ± 1,23	5,84 ± 0,24	0,65 ± 0,91 <sup>d</sup>	6,11 ± 0,0	1,49 ± 2,11	6,11 ± 0,0
7	4,39 ± 3,66	5,97 ± 0,29	6,25 ± 0,54	5,42 ± 0,89	4,18 ± 2,19	5,92 ± 0,44	2,70 ± 0,54	6,15 ± 0,06	4,77 ± 6,74 <sup>d</sup>	6,04 ± 0,01
15	4,23 ± 3,16	5,87 ± 0,45	10,09 ± 0,73	5,38 ± 0,88	2,97 ± 1,06	5,99 ± 0,09	1,93 ± 2,73	6,21 ± 0,1	5,86 ± 2,02	6,01 ± 0,0
21	5,96 ± 2,65	5,58 ± 0,44	11,10 ± 1,13	5,13 ± 0,20	5,51 ± 3,44	5,66 ± 0,53	3,64 ± 2,23	6,10 ± 0,11	6,27 ± 2,48	5,64 ± 0,53
28	7,40 ± 2,19	5,60 ± 0,40	11,15 <sup>e</sup>	5,03 ± 0,0	6,21 ± 3,07	5,63 ± 0,36	4,73 ± 3,13	5,94 ± 0,24	2,92 <sup>c</sup>	6,02 ± 0,0
40	ND <sup>f</sup>	ND	12,71	5,30 ± 0,0	ND	ND	ND	ND	9,12	5,30 ± 0,0
60	7,83 ± 2,98	5,16 ± 0,59	11,80 ± 0,63	5,21 ± 0,01	6,18 ± 4,23	5,46 ± 0,33	5,31 ± 7,52 <sup>d</sup>	5,82 ± 0,38	8,16 ± 5,27	5,49 ± 0,41
90	7,59 ± 3,37	5,221 ± 0,71	12,23	5,31 ± 0,00	7,00 ± 4,76	5,71 ± 0,37	10,63 ± 1,89	5,43 ± 0,04	11,88 ± 3,13	5,38 ± 0,16

<sup>a</sup> Média de 5 repetições ± desvio padrão

<sup>b</sup> Média de 2 repetições ± desvio padrão

<sup>c</sup> Média de 3 repetições ± desvio padrão

<sup>d</sup> Média de 2 repetições, com uma das repetições abaixo do limite de detecção (calculado como 0)

<sup>e</sup> Valores de 1 repetição somente para dados sem um desvio padrão listado

<sup>f</sup> Não determinado

TABELA 3. Contagem de bactéria lácticas (BAL) ( $\log_{10}$  UFC por embalagem) e valores de pH em embalagens de salsichas estocadas a 10 °C por 60 dias.

Dias	0,0% lactato de potássio				2,0% lactato de potássio		3,0% lactato de potássio			
	20 UFC <sup>a</sup>		500 UFC <sup>b</sup>		20 UFC <sup>c</sup>		20 UFC <sup>b</sup>		500 UFC <sup>b</sup>	
	BAL	pH	BAL	pH	BAL	pH	BAL	pH	BAL	pH
0	1,70 ± 0,61	5,99 ± 0,28	3,69 ± 1,26	6,10 ± 0,10	1,18 ± 1,18	5,78 ± 0,28	1,63 ± 2,31 <sup>d</sup>	6,11 ± 0,11	1,49 ± 2,11	6,11 ± 0,11
4	6,57 ± 3,23	5,51 ± 0,58	8,45 <sup>c</sup>	5,45 ± 0,59	3,34 ± 0,48	5,87 ± 0,13	4,04 ± 0,88	6,03 ± 0,01	5,30 ± 0,85	6,03 ± 0,04
8	7,70 ± 3,68	5,49 ± 0,33	10,24 ± 0,73	5,13 ± 0,19	4,68 ± 2,79	5,44 ± 0,17	5,30 ± 2,11	6,07 ± 0,02	5,29 ± 0,43	6,03 ± 0,08
11	8,01 ± 2,83	5,08 ± 0,12	10,25 ± 1,13	5,03 ± 0,0	5,25 ± 5,68 <sup>D</sup>	5,51 ± 0,05	7,36 ± 2,60	5,34 ± 0,04	7,15 ± 0,20	5,52 ± 0,31
21	10,52 ± 1,83	5,0 ± 0,50	11,03 ± 1,13	5,28 ± 0,20	9,45 ± 2,71	5,21 ± 0,08	9,75 ± 1,70	5,52 ± 0,20	7,18 ± 4,69	5,73 ± 0,70
28	9,85 ± 1,20	4,96 ± 0,67	ND <sup>E</sup>	ND	10,87 ± 0,49	5,39 ± 0,10	10,62	5,30	7,84	5,51
40	11,24 ± 0,81	5,01 ± 0,77	13,80	5,28	10,95 ± 0,78	5,23 ± 0,25	11,95	5,41	10,95	5,36
60	10,62 ± 1,31	4,94 ± 0,64	13,48	5,37	11,68 ± 0,98	5,55 ± 0,21	11,00 ± 0,36	5,58 ± 0,23	10,93 ± 0,35	5,60 ± 0,05

<sup>a</sup> Média de 4 repetições ± desvio padrão

<sup>b</sup> Média de 2 repetições ± desvio padrão

<sup>c</sup> Valores de 1 repetição somente para dados sem um desvio padrão listado

<sup>d</sup> Média de 2 repetições, com uma das repetições abaixo do limite de detecção (calculado como 0)

<sup>e</sup> Não determinado

Esses dados indicam que a adição de lactato de potássio surtiu efeito na população de bactérias lácticas, mas não nos valores de pH, em salsichas embaladas a vácuo. Os resultados das análises químicas das salsichas constam da Tabela 4. Pequenas diferenças foram observadas nos teores de cloreto de sódio, proteína, lipídios, nitrito e compostos fenólicos entre as duas formulações de salsichas embaladas a vácuo. Entretanto, uma variação de três vezes na população inicial de bactérias lácticas e uma diferença de 0,5 unidades nos valores de pH foram observadas entre as formulações testadas. O fato de salsichas formuladas sem a adição de lactato de potássio terem apresentado 0,957% de ácido láctico não restou esclarecido, sendo possível que a presença do ácido láctico em salsichas formuladas sem adição de lactato de potássio seja devida à produção de ácido láctico *post mortem* no tecido muscular.

TABELA 4. Composição físico-química de salsichas embaladas a vácuo preparadas sem e com 3% de lactato de potássio.

Análises	0,0% de lactato de potássio	3,0% de lactato de potássio
NaCl (g/100 g)	1,73	2,00 <sup>a</sup>
Proteína (g/100 g)	11,26	9,05
Lipídios (extrato etéreo) (g/100 g)	28,96	29,89
Ácido láctico (g/100 g)	0,957	3,27
pH	6,18	5,68
Nitrito (µg/g)	4,17	4,79
Compostos fenólicos (como catequinas) (µg/g)	803	811

<sup>a</sup> Composição centesimal foram realizadas em duas amostras de uma repetição do dia zero.

#### 4.6.3 Sobrevivência de *L. monocytogenes* em embalagens de salsichas estocadas a 4 e 10 °C

Em relação ao inóculo inicial ou temperatura de incubação, os números do patógeno foram consideravelmente menores em salsichas formuladas com 2% ( $P < 0,0004$ ) ou 3% ( $P < 0,0001$ ) de lactato de potássio do que em salsichas formuladas sem o aditivo. Entretanto, a análise estatística não mostrou diferenças significativas entre o efeito bactericida de salsichas formuladas com a adição de 2% ou 3% de

lactato de potássio. Mais precisamente, os números do patógeno para salsichas formuladas com 2% de lactato de potássio, que foram inoculadas com aproximadamente 20 UFC por embalagem, permaneceram em 1,6 log<sub>10</sub> UFC por embalagem durante 90 dias de estocagem a 4 °C (Figura 1). Quando salsichas foram formuladas com a adição de 3% de lactato de potássio e estocadas a 4 °C por 90 dias, os números do patógeno permaneceram em 1,4 log<sub>10</sub> UFC por embalagem. Para salsichas formuladas com a adição de 3% de lactato de potássio, inoculadas com aproximadamente 500 UFC por embalagem e estocadas a 4 °C, os números do patógeno permaneceram em 2,4 log<sub>10</sub> UFC por embalagem durante 90 dias. Porém, quando salsichas foram formuladas sem a adição de lactato de potássio e estocadas a 4 °C durante 90 dias, os números do patógeno aumentaram para 4,6 e 5,0 log<sub>10</sub> UFC por embalagem, com números iniciais de inóculo de 20 e 500 UFC, respectivamente.

Durante estocagem a 10 °C (Figura 2), com salsichas formuladas com 2% de lactato de potássio e inoculadas com aproximadamente 20 UFC por embalagem, os números do patógeno permaneceram estáveis em 1,4 log<sub>10</sub> UFC por embalagem após 60 dias de estocagem. Já as salsichas formuladas com 3% de lactato de potássio, os números do patógeno permaneceram em 1,1 e 2,4 log<sub>10</sub> UFC por embalagem após 60 dias de estocagem, para números iniciais de inóculo de 20 e 500 UFC, respectivamente. Para as salsichas formuladas sem a adição de lactato de potássio e inoculadas com aproximadamente 20 UFC, os números do patógeno aumentaram para 6,5 log<sub>10</sub> UFC por embalagem após 28 dias de estocagem e declinaram para 4,9 log<sub>10</sub> UFC por embalagem após 60 dias de estocagem. Quando formuladas sem a adição de lactato de potássio e inoculadas com aproximadamente 500 UFC, os números do patógeno aumentaram para 6,6 log<sub>10</sub> UFC por embalagem após 40 dias, declinando para 5,5 log<sub>10</sub> UFC por embalagem após 60 dias de estocagem. Esses resultados evidenciam um potencial antibacteriano da adição de lactato de potássio em salsichas estocadas em baixas temperaturas.

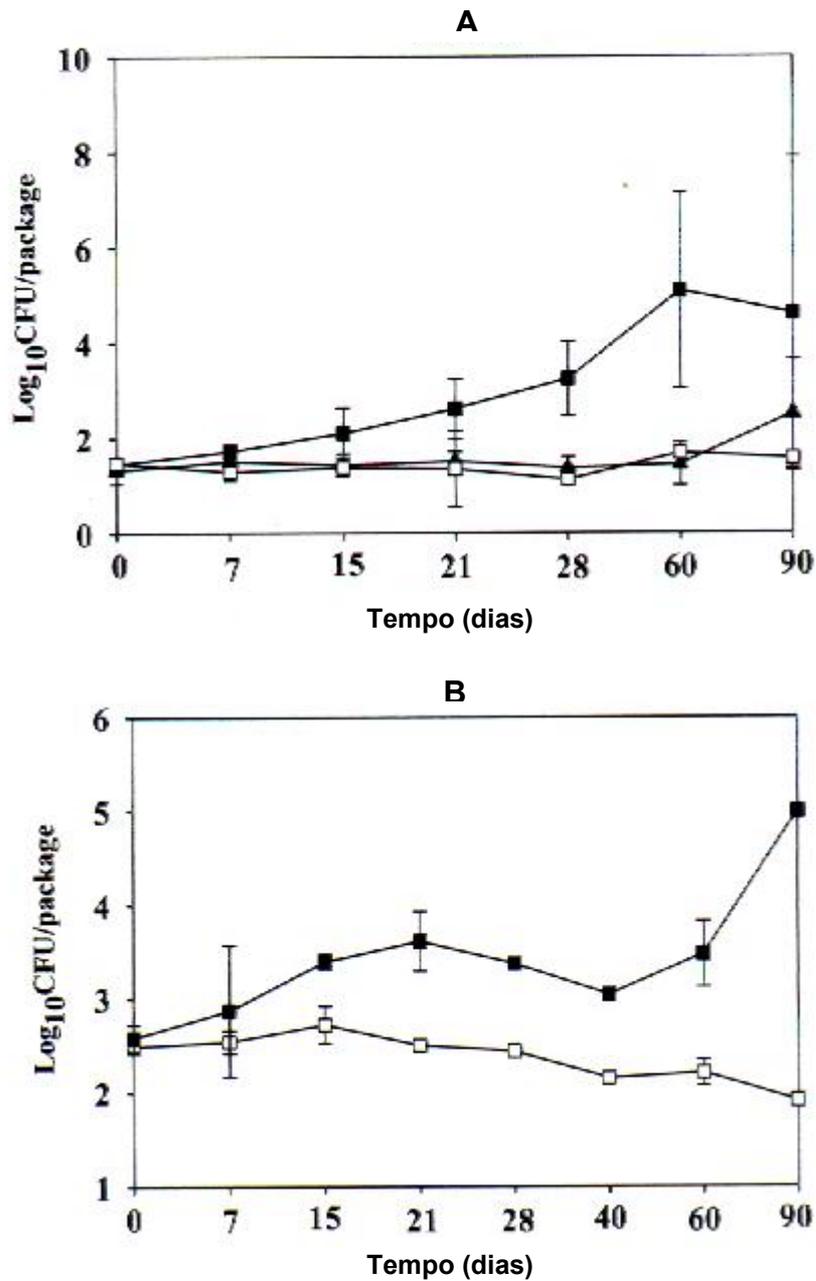


Figura 1. Sobrevivência de *L. monocytogenes* a 4 °C em salsichas inoculadas com (A) 20 e (B) 500 UFC por embalagem contendo 0,0% (■; n = 5), 2,0% (▲; n = 3), e 3,0% (□; n = 2) de lactato de potássio. Embalagens foram inoculadas com uma mistura de cinco cepas (Scott A, H7776, LM-101, F6854, e MFS-2). Barras verticais representam o desvio padrão da média.

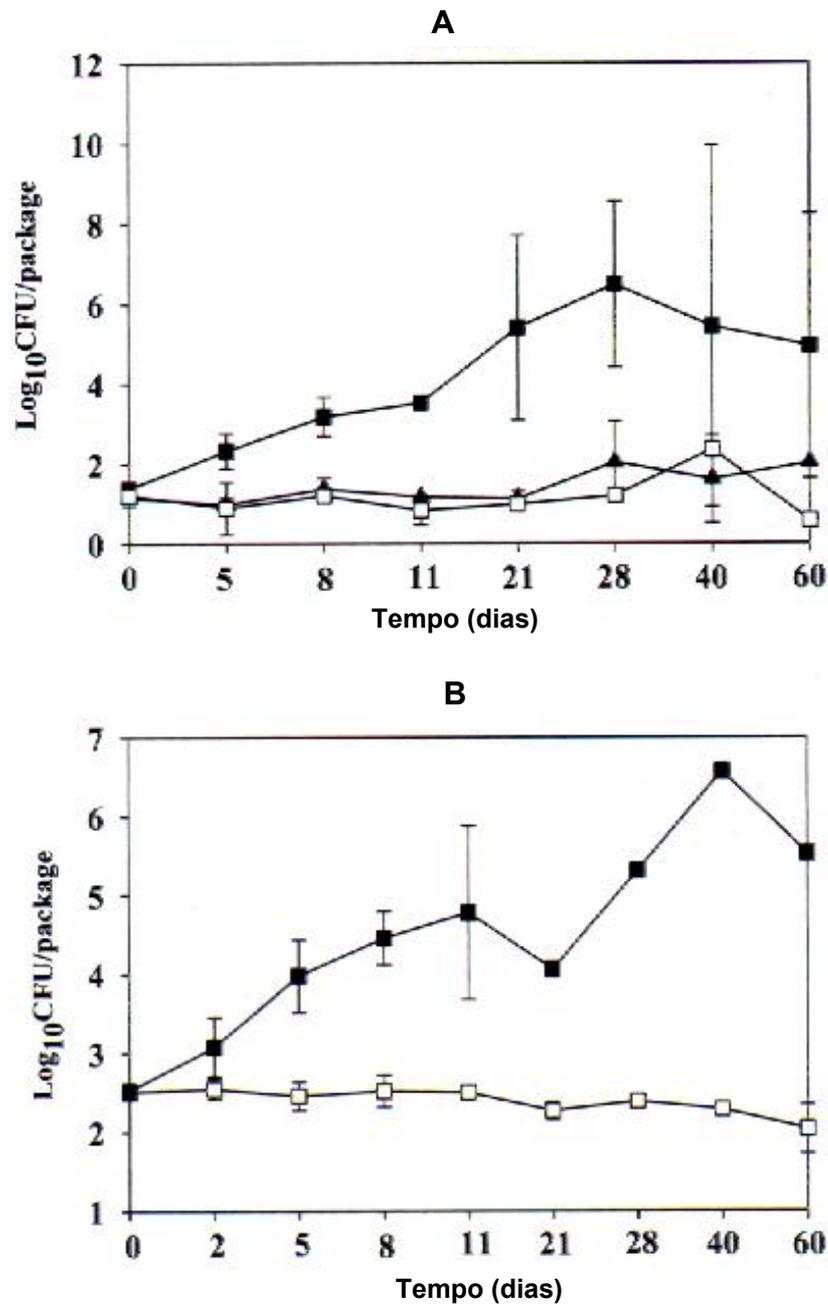


Figura 2. Sobrevivência de *L. monocytogenes* a 10 °C em salsichas inoculadas com (A) 20 e (B) 500 UFC por embalagem contendo 0,0% (■; n = 4), 2,0% (▲; n = 3), e 3,0% (□; n = 2) de lactato de potássio. Embalagens foram inoculadas com uma mistura de cinco cepas (Scott A, H7776, LM-101, F6854, e MFS-2). Barras verticais representam o desvio padrão da média.

## 4.7 DISCUSSÃO

Nos últimos vinte anos, *L. monocytogenes* tem sido relacionada a diversas doenças e a uma ampla variedade de alimentos. Entretanto, até o surto de 1998 a 1999, pelo consumo de salsichas, e o surto de 2000, associado a produtos cárneos de *delicatessen*, produtos cárneos prontos para consumo não haviam sido relacionados à listeriose na América do Norte. A associação de *L. monocytogenes* a gama diversa de produtos prontos para consumo desempenha importante papel na segurança alimentar do consumidor. Esses surtos impulsionaram novas pesquisas no desenvolvimento e melhoramento de processos e/ou produtos visando eliminar ou melhorar o controle de *L. monocytogenes* em produtos cárneos cozidos prontos para consumo.

Além de intervenções físicas (p. ex., vapor, raios X e alta pressão) e biológicas (p. ex., bactérias lácticas e agentes microbianos associados), intervenções químicas de grau alimentar (p. ex., benzoato, lactato, diacetato e sorbato) têm sido amplamente estudadas. Em relação a essas últimas, poucos estudos foram realizados na quantificação dos efeitos da composição química na sobrevivência de *L. monocytogenes* em carnes embaladas a vácuo durante estocagem prolongada e/ou refrigerada (DEGNAN et al., 1992; FAITH et al., 1992; YOUSEF et al., 1991). Em continuidade aos nossos estudos, foi avaliado o efeito da formulação em salsichas embaladas a vácuo preparadas com ou sem adição de lactato de potássio na sobrevivência de números relativamente baixos de *L. monocytogenes*. Além do uso como agente flavorizante, o USDA/FSIS aprovou o uso de até 4,8% de lactato de sódio e potássio na formulação final e produtos cárneos cozidos para retardar a multiplicação de patógenos (FEDERAL REGISTER, 2000).

Pesquisa na literatura específica revelou que estudos adicionais são necessários para melhor quantificar os efeitos da formulação na eliminação de números relativamente baixos de *L. monocytogenes* em salsichas de pequeno diâmetro cozidas, especificamente a contribuição antibacteriana de lactatos em salsichas de carne. A maioria dos ácidos orgânicos, como os ácidos acético e

lático, que são permitidos em alimentos, é utilizada como acidulantes, enquanto os sais de ácidos orgânicos como o sorbato de potássio e benzoato de sódio são usados como conservantes (BUNCIC et al., 1995; DOORES, 1983; PODOLAK et al., 1996; SHELEF, 1994; WEDERQUIST et al., 1994).

Conforme pesquisa de Lou e Yousef (1999), apesar do(s) mecanismo(s) de ação não ser(em) elucidado(s) com precisão, a utilização de lactatos de 2% a 4% é geralmente mais efetiva em alimentos do que em meios sintéticos. Chen e Shelef (1992) comparando sais de lactato de cálcio, potássio e sódio, revelaram que os sais testados foram igualmente eficazes na inibição de *L. monocytogenes* em carne cozida durante estocagem a 20 °C. Shelef e Yang (1991) também relataram que concentração de 4% de lactato de sódio e potássio retardou a multiplicação de *L. monocytogenes* durante estocagem sob refrigeração de carne de frango moída estéril. Ainda sobre o assunto, Weaver e Shelef (1993) reportaram que lactato de cálcio foi mais eficiente do que lactato de sódio ou potássio na inibição do patógeno em salame de fígado de porco durante estocagem a 5 e 20 °C. Os resultados do presente estudo estão de acordo com as referidas pesquisas, porquanto constatado que na ausência de lactato de potássio, os números do patógeno aumentaram consideravelmente durante o período de estocagem.

Inúmeros estudos relatam a multiplicação ou sobrevivência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos prontos para consumo embalados a vácuo, incluindo produtos do tipo salsichas (BERSOT et al., 2001; BUNCIC et al., 1991; HUDSON et al., 1992; McKELLAR et al., 1994; VELANI; GILBERT, 1990). Todavia, divergências nos números e sobrevivência do patógeno entre esses estudos podem ser explicadas pelas diferenças nos tipos, níveis e estado fisiológico das cepas, bem como diferenças na formulação, técnicas de processamento e tempo de produção das salsichas. Os resultados do presente estudo mostraram que lactato de potássio como um ingrediente em salsichas teve efeito bacteriostático em salsichas embaladas a vácuo durante estocagem a 4 e 10 °C. A atividade antibacteriana não foi devida somente ao efeito do pH, uma vez que os valores de pH em embalagens contendo salsichas formuladas com lactato de potássio foram similares às aquelas formuladas sem o aditivo. Outros pesquisadores também relataram que o lactato de

cálcio e o de potássio não implicaram no decréscimo de pH em alimentos, o que geralmente ocorre com a adição do lactato de sódio (SHELEF; POTLURI, 1995).

Em resumo, os dados obtidos neste estudo evidenciam que salsichas embaladas a vácuo podem ser um meio viável para a multiplicação e sobrevivência de *L. monocytogenes*. A sobrevivência do patógeno pode ter dependido, ao menos em parte, do valor do pH inicial, dos níveis e tipos de bactérias lácticas e, possivelmente, da composição centesimal do produto. Como esperado, os números do patógeno aumentaram mais rapidamente durante estocagem a 10 °C do que durante estocagem a 4 °C, e isso pode ou não ter sido consequência de um efeito similar na população natural e competitiva de bactérias lácticas. O mais importante é que os resultados convalidam as contribuições antibacterianas do lactato de potássio como ingrediente em produtos cárneos prontos para consumo. Dada a resistência térmica dos lactatos em geral, esta pode ser uma estratégia simples e de baixo custo, principalmente para pequenos produtores, para aumento da segurança microbiológica produtos cárneos cozidos. Estudos futuros deverão ser focados na otimização da concentração de lactato de potássio requerido para obtenção do flavor desejado, mantida a atenção em efeito antibacteriano. Também deverá ser observada a clonalidade e sucessão de bactérias lácticas dentro das embalagens de salsichas seladas a vácuo, bem como o monitoramento das cepas isoladas para verificação de antagonismo direto contra *L. monocytogenes*

#### AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer James Lindsay (USDA/ARS, Beltsville, MD), Mansour Samadpour (Universidade de Washington, Seattle, WA), Alan Oser (Hatfield Quality Meats, Hatfield, PA), John Phillips (USDA/ARS/ERRC, Wyndmoor, PA), Jenny Romano (USDA/ARS/ERRC, Wyndmoor, PA), Benne Marmer (USDA/ARS/ERRC, Wyndmoor, PA), Bala Swaminathan (CDCP, Atlanta, GA), Martin Wiedmann (Cornell University, Ithaca, NY) e Lisa Yoder (Hatfield Quality Meats, Hatfield, PA), que muito contribuíram para a conclusão deste estudo, dividindo seus talentos e/ou opiniões. Além disso, agradecemos a Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), que forneceu bolsa de pesquisa no ERRC para o professor Andrea Piva.

#### 4.8 REFERÊNCIAS

1. ANÔNIMO. *Listeria* leads the pack on reason for USDA recalls. **Food Chem. News**, v. 38, p. 28-29, 1996.
2. ANÔNIMO. Food additives for use in meat and poultry products: sodium diacetate, sodium acetate, sodium lactate, and potassium lactate. **Federal Register**, v. 65, n. 63, p. 17128-17129, 2000.
3. BERSOT, L. S.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T. Production of mortadellas: behavior of *Listeria monocytogenes* during process and storage conditions. **Meat Sci.**, v. 57, p.13-17, 2001.
4. BUCHANAN, R. L.; STAHL, H. G.; BENCIVENGO, M. M.; DEL CORRAL, F. Comparison of lithium chloride-phenylethanol-moxalactam and modified Vogel Johnson agars for the detection of *Listeria* spp. in retail-level meats, poultry, and seafood. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 5, p. 599-603, 1989.
5. BUCHANAN, R. L.; DAMERT, W. G.; WHITING, R. C.; VAN SCHOTHORST, M. Use of epidemiologic food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. **J. Food Protect.**, v. 60, p. 918-922, 1997.
6. BUNCIC, S.; PAUNOVIC, L.; RADISIC, D. The fate of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages and in vacuum-packaged frankfurters. **J. Food Protect.** v. 54, p. 413-417, 1991.
7. BUNCIC, S.; FITZGERALD, C. M.; BELL, R. G.; HUDSON, J. A. Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperatures. **J. Food Safety**, v. 15, p. 247-264, 1995.
8. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreak of listeriosis - United States, 1998. Morbid. **Mortal. Weekly Rpt.**, v. 47, n. 50, p.1085-1086, 1998.

9. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreak of listeriosis - United States, 2000. **Morbid. Mortal. Weekly Rpt.**, v. 49, n. 50, p. 1129-1130, 2000.
10. CHEN, N.; SHELEF, L. A. Relationship between water activity, salts of lactic acids, and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat system. **J. Food Protect.**, v. 55, p. 574-578, 1992.
11. COOK, L. V. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg, and environmental samples. Chapter 8, In: **USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook**. 3. ed., Revision 2, 1999.
12. DALTON, C. B., AUSTIN, C. C.; SOBEL, J.; HAYES, P. S.; BIBB, W. F.; GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B.; PROCTOR, M. E.; GRIFFIN, P. M. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **N. Engl. J. Med.**, v. 336, p. 100-105, 1997.
13. DEGNAN, A. J.; YOUSEF, A. E.; LUCHANSKY, J. B. Use of *Pediococcus acidilactici* to control *Listeria monocytogenes* in temperature-abused vacuum-packaged wieners. **J. Food Protect.**, v. 55, p. 98-103, 1992.
14. DOORES, S. Organic acids., In: **Antimicrobials in Foods**. 2. ed. DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. (Ed.). New York: Marcel Dekker. 1993. p. 95-136.
15. FAITH, N. G.; YOUSEF, A. E.; LUCHANSKY, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by liquid smoke and isoeugenol, a phenolic component found in smoke. **J. Food Safety**, v. 12, p. 303-314, 1992.
16. FARBER, J. M.; PERTERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 476-521, 1991.
17. GILLESPIE, I.; LITTLE, C.; MITCHELL, R. Microbiological examination of cold ready-to-eat sliced meats from catering establishments in the United Kingdom. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 467-474, 2000.
18. GLASS, K. G.; DOYLE, M. P. Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat during refrigerated storage. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 1565-1569, 1989.

19. HUDSON, A. W.; MOTT, S. J.; DELACY, K. M.; EDRIDGE A. L. Incidence and coincidence of *Listeria* spp., motile aeromonads, and *Yersinia enterocolitica* on ready-to-eat fleshfoods. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 16, p. 99-108, 1992.
20. JAY, J. M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**, v. 7, p. 209-214, 1996.
21. JOHNSON, J. L.; DOYLE, M. P.; CASSENS, R. G. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products: a review. **J. Food Protect.**, v. 53, p. 81-91, 1990.
22. LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; LOU, X. D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C.; HIRD, D. W.; YONEKURA, M. L.; HAYES, P.; WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLIKAYTIS, B. D.; FANNIN, S. L.; KLEKS, A.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **N. Engl. J. Med.**, v. 319, p. 823-828, 1988.
23. LOU, L.; YOUSEF, A. E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: **Listeria, listeriosis, and food safety**. RYSER, E. T.; MARTH, E. H. (Ed.). New York: Marcel Dekker. 1999. p. 131-224.
24. McNEAL, J. E. Meat and meat products, In: HERLICH, K. (ed.), Official methods of analysis, 15<sup>th</sup> ed. **Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, VA .1990. pp. 931-938.
25. McKELLAR, R. C.; MOIR, R.; KALAB, M. Factors influencing the survival and growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of Canadian retail wieners. **J. Food Protect.**, v. 57, p. 387-392, 1994.
26. MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infect. Dis.**, v. 5, p. 607-625, 1999.
27. MORRIS, I. J., RIBEIRO, C. D. *Listeria monocytogenes* and pate. **Lancet**, v.ii, p. 1285-1286, 1989.
28. NORRUNG, B.; ANDERSEN, J. K.; SCHLUNDT, J. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. **Intl. J. Food Microbiol.**, v. 53, p.195-203, 1999.

29. PODOLAK, R. K.; ZAYAS, J. F.; KASTNER, C. L.; FUNG, Y. D. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. **J. Food Protect.**, v. 59, p. 370-373, 1996.
30. PORTO, A. C. S., PIVA, A.; CALL, J. E.; LUCHANSKY, J. B. Fate of *Listeria monocytogenes* on frankfurters containing potassium lactate. Abstr. 59E-22, p. 144. **2001 IFT Annu. Meet. Book of Abstracts**. 2001 Annu. Meet. Institute of Food Technologists, New Orleans, LA.
31. PROCTOR, M. E.; BROSCHE, R.; MELLEN, J. W.; GARRETT, L. A.; KASPAR, C. W.; LUCHANSKY, J. B. Use of pulsed-field gel electrophoresis to link sporadic cases of invasive listeriosis with recalled chocolate milk. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 3177-3179, 1995.
32. QVIST, S.; LIBERSKI, D. *Listeria monocytogenes* in frankfurters and ready-to-eat sliced meat products. **Dan. Veterinaertidsskr**, v. 74, p. 773-778, 1991.
33. RYSER, E. T.; MARTH E. H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker. 1999.
34. SCHUCHAT, A., DEEVER, K. A.; WENGER, J. D.; PLIKAYTIS, B. D.; MASCOLA, L. Role of foods in sporadic listeriosis. **JAMA**, v. 267, n. 15, p. 2041-2045, 1992.
35. SCHWARTZ, B., BROOME, C. V.; BROWN, G. R.; HIGHTOWER, A. W.; CIESIELSKI, C. A.; GAVENTA, S.; GELLEN, B. G.; MASCOLA, L. Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. **Lancet**, v. ii, p. 779-782, 1988.
36. SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of lactates: a review. **J. Food Protect.**, v. 57, p. 445-450, 1994.
37. SHELEF, L. A.; POTLURI, V. Behaviour of foodborne pathogens in cooked liver sausage containing lactates. **Food Microbiol.**, v. 12, p. 221-227, 1995.
38. SHELEF, L. A.; YANG, Q. Growth suppression of *Listeria monocytogenes* by lactates in broth, chicken, and beef. **J. Food Protect.**, v. 54, p. 283-287, 1991.

39. TIWARI, N. P.; ALDENRATH, S. G. Occurrence of *Listeria* species in food and environmental samples in Alberta. **Can. Inst. Food Sci. Technol. J.**, v. 22, p. 109-113, 1990.
40. VELANI, S.; GILBERT, R. J. *Listeria monocytogenes* in prepacked ready-to-eat sliced meats. **PHLS Microbiol. Digest.**, v. 7, p. 56, 1990.
41. WALLACE, F. M., III; PORTO, A. C. S.; CALL, J. E.; LUCHANSKY, J. B. Comparison of the approved USDA/FSIS product compositing method and the USDA-ARS package rinsing method for the recovery of *Listeria monocytogenes* from frankfurters. Abstr. 59F-30, p. 149. **IFT Annu. Meet. Book of Abstracts.** 2001. Annu. Meet. Institute of Food Technologists, New Orleans, LA.
42. WANG, C., MURIANA, P. M. 1994. Incidence of *Listeria monocytogenes* in packages of retail franks. **J. Food Protect.**, v. 57, p. 382-386, 1994.
43. WEAVER, R. A.; SHELEF, L. A. Antilisterial activity of sodium, potassium or calcium lactate in pork liver sausage. **J. Food Safety**, v. 13, p. 133-146, 1993.
44. WEDERQUIST, H. J.; SOFOS, J. N.; SCHMIDT, G. R. *Listeria monocytogenes* inhibition in refrigerated vacuum packaged turkey bologna by chemical additives. **J. Food Sci.**, v. 59, p. 498-500, 1994.
45. YOUSEF, A. E.; LUCHANSKY, J. B.; DEGNAN, A. J.; DOYLE, M. P. 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or pediocin AcH during storage at 4 or 25°C. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 1461-1467, 1991.

## **5 CAPÍTULO III**

### **USO DE ELETROFORESE EM GEL EM CAMPO PULSADO (PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS) PARA MONITORAR UMA MISTURA DE CINCO CEPAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM SALSICHAS**

## 4.2 TÍTULO

Use of pulsed-field gel electrophoresis to monitor a five-strain mixture of *Listeria monocytogenes* in frankfurters\*.

PORTO, A. C. S.; WONDERLING, L.; CALL, J. E.; LUCHANSKY, J. B. Trabalho submetido ao **Journal Food Protection**.

\* Trabalho parcial apresentado no 89<sup>o</sup> Annual Meeting International Association of Food Protection, San Diego, California, USA, June 30-July 03, 2002 (PORTO et al., 2002).

## 5.2 RESUMO

Mediante estudo prévio, a sobrevivência de cinco cepas de *Listeria monocytogenes* foram monitoradas durante estocagem de salsichas formuladas com ou sem adição de 3,0% de lactato de potássio, a saber: Scott A (sorotipo 4b), LM-101M (sorotipo 4b), F6854 (sorotipo 1/2a), H7776 (sorotipo 4b) e MFS-2 (sorotipo 1/2a). Após 90 dias de estocagem a 4 °C, o inóculo inicial de 20 UFC por embalagem permaneceu relativamente constante em salsichas formuladas com a adição de 3,0% de lactato de potássio, mas foi observado um aumento de 4,6 log<sub>10</sub> UFC por embalagem na população do patógeno em salsichas formuladas sem aquele aditivo. Para determinar qual das cinco cepas persistiu sob essas condições, foram isoladas aleatoriamente de salsichas colônias do patógeno após 28 e 90 dias de estocagem à temperatura de refrigeração e analisadas por PFGE com enzima de restrição *Sma*I, para gerar bandas padrão para cada uma das cinco cepas testadas. Logo, através do uso de PFGE como uma ferramenta de identificação, a sucessão de cada cepa foi comparada nos 28<sup>o</sup> e 90<sup>o</sup> dias. Na ausência de lactato de potássio, 43% das 58 colônias isoladas no 28<sup>o</sup> dia foram identificados como Scott A, 12% como LM-101M, 22% como F6854, 10% como H7776 e 12% como cepa MFS-2. Entretanto, para colônias isoladas no 90<sup>o</sup> dia, a maioria (83%) das 60 colônias isoladas foi identificada como MFS-2. Em embalagens contendo salsichas formuladas com a adição de 3,0% de lactato de potássio, todas as cinco cepas estiveram presentes (5%-36%) entre as 19 colônias isoladas no 28<sup>o</sup> dia. Entretanto, no 90<sup>o</sup> dia, a cepa MFS-2, uma cepas do sorotipo 1/2a isolada de uma planta de processamento, compreendeu a maioria (63%) das 27 colônias isoladas. Os resultados deste estudo indicaram que a cepa MFS-2 foi mais persistente do que as cepas Scott A, LM-101M, F6854 e H7776 durante estocagem prolongada de salsichas à temperatura de refrigeração.

**Palavras-chave:** *Listeria monocytogenes*, salsichas, eletroforese em gel em campo pulsado.

### 5.3 ABSTRACT

In a previous study, the viability of the following five-strain mixture of *Listeria monocytogenes* was monitored during refrigerated storage of frankfurters prepared with and without 3.0% added potassium lactate: Scott A (serotype 4b, clinical isolate), 101M (serotype 4b, beef/pork sausage isolate), F6854 (serotype 1/2a, turkey frankfurter isolate), H7776 (serotype 4b, frankfurter isolate), and MFS-2 (serotype 1/2a, pork plant isolate). Throughout a 90-day period at 4°C, the initial inoculum of 20 CFU per package remained relatively constant in packages containing frankfurters prepared with potassium lactate, but there was an increase to 4.6 log<sub>10</sub> of the pathogen in packages containing frankfurters prepared without added potassium lactate. To determine which of the five strains persisted under these conditions, randomly-selected colonies obtained after 28 and 90 days of refrigerated storage of frankfurters were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with the restriction enzyme *Sma*I to generate distinct banding patterns for each of these five strains. Then, using PFGE as a tool for identification, the succession of each strain was compared on days 28 and 90 of the growth study. In the absence of any added potassium lactate in the product, 43% of the 58 isolates recovered on day 28 were identified as strain Scott A, 12% as 101M, 22% as F6854, 10% as H7776, and 12% as MFS-2. However, by day 90, an appreciable number (83%) of the 60 isolates analyzed were identified as strain MFS-2. In packages containing frankfurters formulated with 3.0% added potassium lactate, all five strains were present at a frequency of 5 to 36% among the 19 isolates tested on day 28; however, by day 90, strain MFS-2 comprised the statistical majority (63%) of the 27 isolates tested. The results of this study indicated that strain MFS-2, a serotype 1/2a isolate recovered from a pork processing plant, was more persistent than strains Scott A, 101M, F6854, and H7776 during extended refrigerated storage of frankfurters.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, frankfurters, pulsed-field gel electrophoresis.

## 5.4 INTRODUÇÃO

Vários estudos têm sido publicados em relação à multiplicação e à sobrevivência de *L. monocytogenes* associadas a produtos cárneos prontos para consumo (GLASS; DOYLE, 1989; GLASS et al., 2002; McKELLAR et al., 1994; PORTO et al., 2002; QVIST et al., 1994; YOUSEF et al., 1991). Intervenções como processamento térmico, processamento em alta pressão, defumação, sais de cura e/ou adição de compostos antimicrobianos têm sido aplicadas visando à segurança microbiológica e extensão da vida de prateleira de salsichas embaladas a vácuo (BEDIE et al., 2001; FAITH et al., 1992; GLASS et al., 2002; ISLAM et al., 2002; LUCORE et al., 2000; SAMELIS et al., 2002). Apesar das informações já obtidas sobre a sobrevivência e a multiplicação de *L. monocytogenes* em salsichas, poucos estudos verificaram o comportamento individual de uma cepa de *L. monocytogenes* dentre uma mistura de cepas do patógeno em salsichas e/ou se determinadas cepas podem exibir vantagens sobre outras cepas, já que algumas cepas exibem respostas variáveis a estresse do meio (BUNCIC et al., 2001; MACKEY et al., 1990; PALUMBO et al., 1995; RASCH; KNØCHEL, 1998), e algumas cepas são mais virulentas do que outras (BROSCH et al., 1993; DEL CORRAL et al., 1990; HERD; KNOCKS, 2001; JEFFERS et al., 2001; ROCHE et al., 2001)

Em estudo prévio, relatou-se a sobrevivência de uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes* durante 90 dias sob refrigeração em salsichas formuladas com ou sem adição de 3,0% de lactato de potássio (PORTO et al., 2002). Resumidamente, não foi observada a multiplicação do patógeno em embalagens contendo salsichas formuladas com 3,0% de lactato de potássio, mas um aumento próximo a  $5 \log_{10}$  UFC por embalagem nos números do patógeno em salsichas formuladas sem adição de 3,0% de lactato de potássio. O objetivo do trabalho foi determinar a sucessão e persistência de cinco cepas de *L. monocytogenes* isoladas do experimento antes descrito. Para isso, as cinco cepas foram analisadas por gel eletroforese de campo pulsado (PFGE) como um método de diferenciação das cepas. Em seguida, as colônias isoladas na enumeração do patógeno durante o 28<sup>o</sup> e o 90<sup>o</sup> dias foram identificadas através de seus perfis

genéticos, os quais permitiram verificar a sucessão de cada uma das cinco cepas em embalagens de salsichas durante estocagem a 4 °C.

## **5.5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.5.1 Preparo e inoculação das salsichas embaladas a vácuo**

A inoculação de salsichas embaladas a vácuo com *L. monocytogenes* na fase estacionária foi previamente descrita (item 3.5.1). Um total de cerca 20 UFC de cinco cepas de *L. monocytogenes*, cerca de 4 UFC por cepa (Tabela 5), foi usado para inocular embalagens de salsichas comercialmente preparadas, as quais foram então incubadas a 4 °C por 90 dias. Duas formulações de salsichas de carne suína e bovina foram testadas: uma formulação contendo lactato de potássio (Purac America, Inc., Lincolnshire, Ill.), adicionada uma concentração final de 3,0% na emulsão salsichas, e outra sem a adição de lactato de potássio.

### **5.5.2 Análises microbiológicas e análise estatística**

A sobrevivência de *L. monocytogenes* após 90 dias de incubação a 4 °C foi determinada por semeadura em superfície em ágar Oxford modificado (MOX) (COOK, 1999). Simultaneamente, a multiplicação de bactéria lácticas (BAL) foi monitorada por semeadura em superfície em ágar Rogosa SL (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). Cerca de 60 colônias de *L. monocytogenes* para cada formulação foram selecionadas aleatoriamente no 28<sup>o</sup> e no 90<sup>o</sup> dias de amostragem de placas de ágar Oxford modificado e estocadas a - 80 °C em caldo infusão cérebro coração (BHI; Difco Laboratories Inc., Detroit, MI) adicionado de 20% de glicerol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Foram realizadas duas repetições, e três embalagens de salsichas foram analisadas por tempo de amostragem. Para a análise estatística dos resultados, foi usado teste de qui-quadrado para determinar se o isolamento das cinco cepas testadas diferiram significativamente entre si. Além disso, as frequências

do isolamento da cepa MFS-2 para o dia 90 em ambas as formulações de salsichas foram comparadas usando o teste de qui-quadrado.

### 5.5.3 Eletroforese em gel em campo pulsado

A técnica de PFGE foi submetida de acordo com o protocolo de Graves e Swaminathan (2001). As colônias de *L. monocytogenes* foram isoladas de placas contendo ágar BHI após 16 h de incubação a 37 °C. Utilizando-se um *swab*, as células foram suspendidas em 1,2 ml de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e a densidade óptica foi ajustada para  $1,40 \pm 0,05$  a 610 nm. Solução de lisozima (100 µl de 10 mg/ml) (Sigma) foi adicionada para 400 µl de suspensão bacteriana e os tubos foram incubados por 10-15 minutos em banho de água a 37 °C. Os plugs foram preparados misturando-se o mesmo volume da suspensão com agarose a 1,6% (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) e solução de SDS a 1% (Sigma) contendo 0,9 mg/ml de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Alíquotas da suspensão foram dispensadas em moldes de acrílico para plugs (0,1 ml) e deixadas para solidificar por 20 minutos. Os plugs foram transferidos para tubos de centrifuga de 50 ml estéreis contendo 4-5 ml de tampão de lise celular (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% sarcosina, 0,1 mg/ml proteinase K) e incubados a 55 °C por 2-4 h em banho de água com agitação. Os plugs foram lavados duas vezes em água bidestilada pré-aquecida e duas vezes em tampão TE (650 ml para cada enxágüe) em um lavador de plugs de PVC por 30 minutos em cada fase. Plugs de agarose contendo DNA foram seccionados em 10 fatias, e, então, cada fatia foi digerida com 45 U de *Sma*I por 18-24 h a 25 °C. Os plugs foram incorporados em géis de agarose de grau de eletroforese (Bio-Rad) e análises de campo pulsado foram realizadas usando-se um sistema Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) mapper XA (Bio-Rad), em tampão TBE 0,5X (45mM Tris, 45mM ácido bórico, 1mM EDTA, pH 8,0) a 200V com um ângulo de 120°, e pulsos de 4 a 40 segundos durante 22 h a 14 °C. Após eletroforese, os géis foram tingidos com uma solução de 5% de brometo de etídio seguido pela descoloração em água destilada e

fotodocumentados. As imagens obtidas foram analisadas com o software *Multi-Analyzer Gel Documentation* (Bio-Rad, Hercules, CA).

Tabela 5. Cepas de *L. monocytogenes* utilizadas para inocular embalagens de salsichas preparadas comercialmente.

Cepa	Sorotipo	Fonte <sup>a</sup>
Scott A	4b	Clínico
101 M	4b	Salame de carne bovina e suína
F6854	1/2a	Salsicha de peru
H7776	4b	Salsicha
MFS-2	1/2a	Planta de processamento de carne suína

<sup>a</sup> PORTO et al., 2002.

## 5.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cada uma das cinco cepas de *L. monocytogenes* foi caracterizada por PFGE com endonucleases de restrição *Ascl*, *Apal* e *Smal* para avaliar qual enzima geraria o perfil de padrão de bandas mais discernível (dados não mostrados). A enzima de restrição *Smal* gerou os fragmentos mais discerníveis do que *Ascl* e *Apal* para as cinco cepas de *L. monocytogenes*, as quais apresentaram um perfil genético único gerado com a enzima de restrição *Smal* (Figura 3).

A sobrevivência de uma mistura das cinco cepas de *L. monocytogenes* em salsichas formuladas com ou sem adição de 3,0% de lactato de potássio foi monitorada por semeadura em superfície em ágar Oxford modificado. A 4 °C, na ausência de lactato de potássio, os números do patógeno aumentaram 4,6 log<sub>10</sub> UFC por embalagem após 90 dias, enquanto nenhum crescimento foi observado na presença de 3,0% de lactato de potássio durante os 90 dias de estocagem (PORTO et al., 2002). Similarmente, a multiplicação de bactérias lácticas (BAL) foi enumerada por semeadura em superfície em placas de ágar Rogosa SL. A 4° C, na ausência da adição de lactato de potássio, os números de BAL aumentaram de uma população

inicial de 2,9 para 7,6  $\log_{10}$  UFC por embalagem após 90 dias, enquanto os números de BAL aumentaram de uma população inicial de 0,7 para 10,6  $\log_{10}$  UFC por embalagem após 90 dias de incubação na presença da adição de 3,0% de lactato de potássio (PORTO et al., 2002).

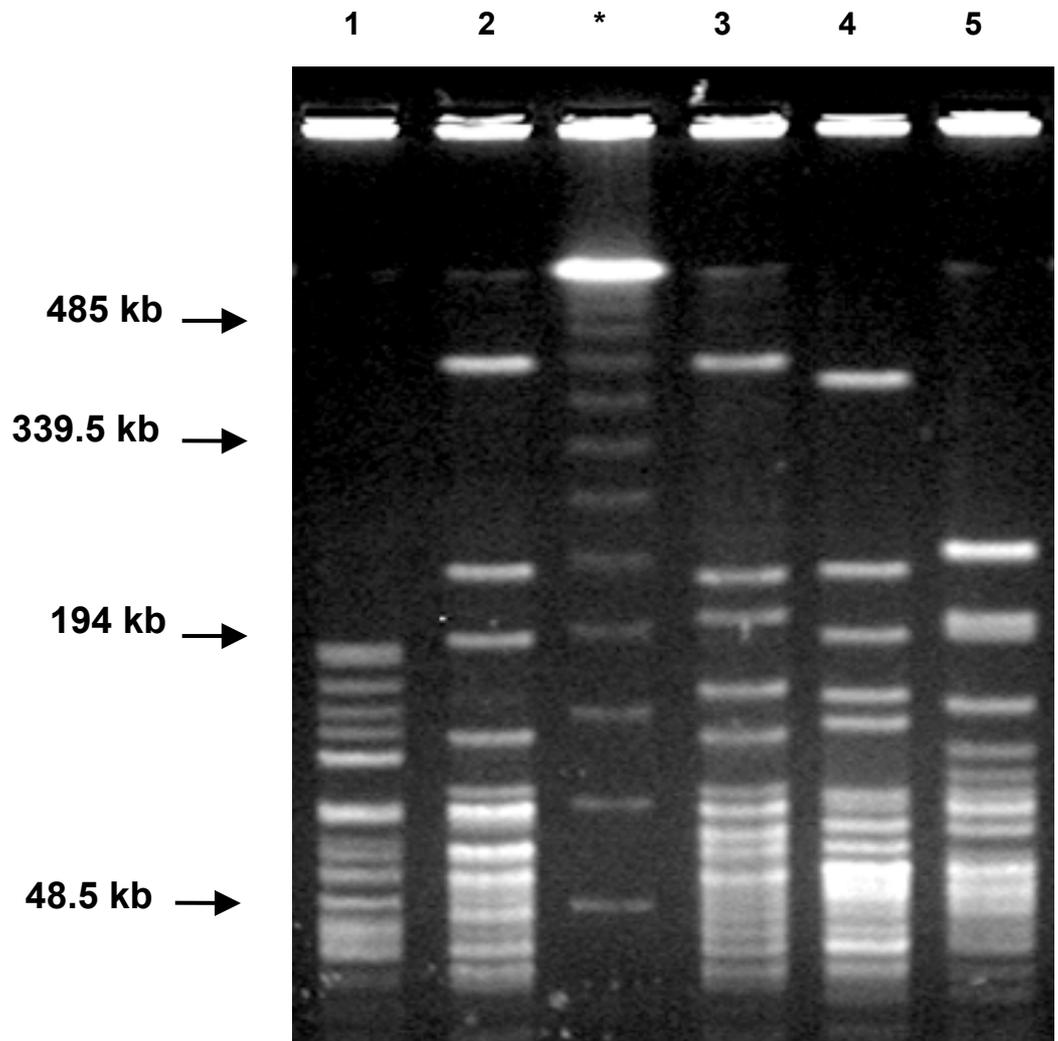


Figura 3. Bandas padrão de DNA cromossômico gerado por endonuclease de restrição de cepas de *L. monocytogenes*. Linhas: 1, MFS-2; 2, F6854 (sorotipo 1/2a); \*, marcador, 3, 101M; 4, H7776; e 5, Scott A .

Em embalagens contendo salsichas formuladas sem a adição de lactato de potássio que foram inoculadas com 20 UFC/embalagem e armazenadas por até 90 dias a 4 °C, colônias foram isoladas de ágar MOX usado para enumerar o patógeno após 28 (58 cepas isoladas) e 90 (60 cepas isoladas) dias de incubação. A análise por PFGE das 58 cepas isoladas no 28<sup>o</sup> dia demonstrou que cada cepa compreendeu de 10% a 43% do total do número de colônias isoladas (Figura 4A). A análise estatística das taxas de isolamento evidenciou que a cepa Scott A foi isolada em uma taxa significativamente ( $P = 0,0002$ ) maior do que as outras quatro cepas. Entretanto, no 90<sup>o</sup> dia, a análise estatística das 60 cepas isoladas revelou que a cepa MFS-2 apresentou uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,0001$ ) da maioria (83%, 50 de 60) das cepas isoladas, e que as outras quatro cepas compreenderam entre 0% e 7% da população de *L. monocytogenes* isolada.

Em salsichas formuladas com a adição de 3,0% de lactato de potássio, colônias também foram isoladas de ágar MOX usadas para enumerar *L. monocytogenes* após 28 (19 cepas isoladas) e 90 (27 cepas isoladas) dias de incubação a 4 °C. Um total de 19 colônias de *L. monocytogenes* foi isolado após 28 dias de incubação. A análise por PFGE das 19 cepas isoladas no 28<sup>o</sup> dia revelou que todas as cinco cepas estavam presentes, com cada cepa compreendendo entre 5% e 37% das cepas isoladas (Figura 4B). Não foi observada evidência estatística de que alguma cepa tenha sido isolada a uma frequência significativamente ( $P = 0,1991$ ) maior ou menor do que outra cepa no 28<sup>o</sup> dia. No 90<sup>o</sup> dia de estocagem a 4 °C, 27 cepas foram isoladas, e a cepa MFS-2 foi predominante, compreendendo uma significativa ( $P < 0,0001$ ) maioria (63%, 17 de 27) da população de *L. monocytogenes* isolada. O restante das colônias de *L. monocytogenes* no 90<sup>o</sup> dia, de embalagens contendo salsichas formuladas com a adição de 3,0% de lactato de potássio, foi F6854 (19%), H7776 (7%), LM-101M (4%) e Scott A (7%).

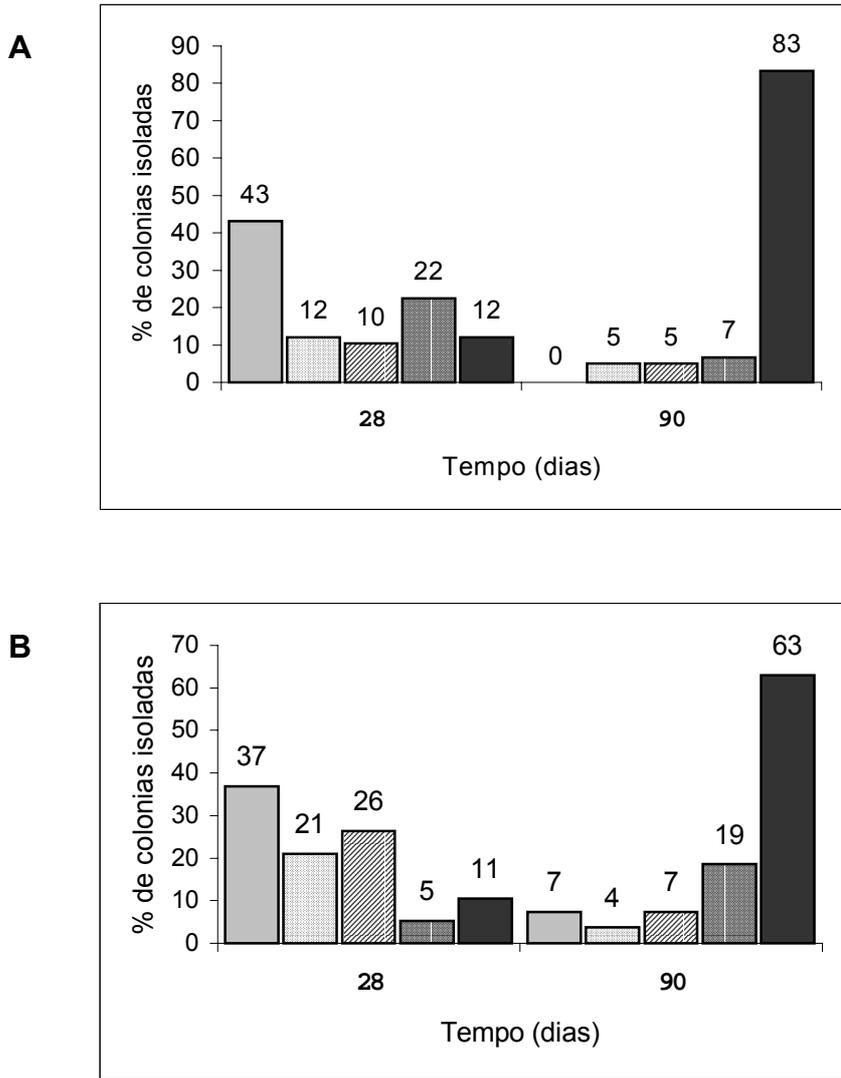


Figura 4. Sucessão de cinco cepas de *L. monocytogenes* (Scott A █ ; 101-M █ ; H7776 █ ; F6854 █ ; e MFS-2 █) em salsichas formuladas com a adição de 0,0% (A) e 3,0% (B) de lactato de potássio e embaladas a vácuo após 28 e 90 dias de estocagem a 4 °C. Os valores acima de cada coluna indicam a porcentagem de isolamento de cada cepa calculado pelo número total de cepas isoladas para cada dia e para cada formulação de salsicha.

Os resultados indicaram que a cepa MFS-2 foi mais competitiva do que as cepas F6854, H7776, LM-101M e Scott A nas formulações de salsichas e condições utilizadas neste estudo. A cepa MFS-2 foi isolada em uma frequência significativamente ( $P = 0,0367$ ) maior em embalagens de salsichas formuladas sem

a adição de lactato de potássio quando comparada com os resultados das embalagens de salsichas formuladas com o aditivo. Isso se deve, possivelmente, ao fato de ter ocorrido uma multiplicação maior do patógeno em embalagens contendo salsichas formuladas sem a adição de lactato de potássio, favorecendo, assim, a multiplicação da cepa MFS-2. Entretanto, outros fatores podem ter contribuído para a predominância da cepa MFS-2, como a presença, números, ou tipos de BAL, a formulação do produto, a presença de ácidos orgânicos e/ou o próprio perfil genético da cepa MFS-2.

Outra característica que pode variar entre os diferentes sorogrupos de *L. monocytogenes* é a resistência a bacteriocinas. Em estudo conduzido por Buncic et al. (2001), cepas do sorogrupo 1/2a foram mais resistentes a duas bacteriocinas do que cepas do sorogrupo 4b em meio de cultura a 4 °C. Os autores concluíram que cepas do sorogrupo 1/2a podem apresentar vantagem competitiva sobre o sorotipo 4b em carnes estocadas sob refrigeração, nas quais bactérias lácticas constituem a maioria da microbiota deteriorante e são conhecidas pela produção de bacteriocinas (BUNCIC et al., 2001). De igual modo, no presente estudo, a presença de uma alta população de bactérias lácticas em embalagens de salsichas pode ter produzido bacteriocinas, ácidos orgânicos ou outros metabólitos antimicrobianos que contribuíram para a incidência da cepa MFS-2, do sorogrupo 1/2a, embora a produção de bacteriocinas e/ou metabólitos antimicrobianos por bactérias lácticas não tenha sido investigada nesta pesquisa.

A cepa F6854, também do sorogrupo 1/2a, não predominou em embalagens de salsichas formuladas sem a adição de lactato de potássio. Contudo, após 90 dias de incubação em embalagens de salsichas formuladas com a adição de lactato de potássio, a cepa F6854 foi isolada em uma frequência de 19%, uma taxa maior de isolamento do que observada para as outras três cepas testadas, todas do sorogrupo 4b. Futuras pesquisas serão necessárias para determinar se as cepas do sorotipo 1/2a, como as cepas MFS-2 e F6854, são realmente mais tolerantes às bactérias lácticas e/ou bacteriocinas e metabólitos antimicrobianos produzidos em salsichas embaladas a vácuo do que as cepas do sorogrupo 4b.

O resultado obtido de que a cepa MFS-2 predominou neste estudo e que foi isolada de uma planta de processamento de carne suína, sugere que a cepa pode ser mais adaptada a produtos cárneos processados do que as outras cepas testadas. Além disso, é necessário considerar que a cepa MFS-2 foi obtida na mesma planta de processamento na qual foram produzidas as salsichas usadas durante a pesquisa, mas isolada aproximadamente dois anos antes da produção do lote de salsichas usado. Talvez seja importante salientar que a cepa MFS-2 sobreviveu melhor em salsichas embaladas a vácuo do que as cepas F6854 e H7776, isoladas originalmente de salsichas. É possível que uma dada formulação de salsichas possa ser seletiva para uma particular cepa de *L. monocytogenes*.

Em resumo, esses resultados indicam que a origem de uma cepa de *L. monocytogenes* pode não ser um indicativo de sua capacidade adaptativa particular, já que, conforme se demonstrou, uma cepa isolada de planta de processamento multiplicou-se melhor em salsichas embaladas a vácuo do que cepas isoladas de salsichas, salame e de um caso clínico. Outras pesquisas serão imprescindíveis para determinar como cepas de *L. monocytogenes* persistem e predominam em alimentos, particularmente em produtos prontos para consumo, onde a contaminação com o patógeno é um risco para saúde pública. Desconhece-se outro estudo que tenha monitorado a sucessão de várias cepas de *L. monocytogenes* durante estocagem de alimentos sob refrigeração, como aqui apresentado. A técnica de PFGE foi essencial para atingir o objetivo do trabalho e será útil para pesquisas que objetivem verificar a competição entre cepas de *L. monocytogenes* em alimentos.

#### AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a John Phillips (USDA/ARS/ERRC, Wyndmoor, PA) pela contribuição nas análises estatísticas, dividindo seu talento e opinião.

## 5.8 REFERÊNCIAS

1. BEDIE, G. K.; SAMELIS, J.; SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SCANGA, J. A.; SMITH, G. C. Antimicrobials in the formulation to control *Listeria monocytogenes* postprocessing contamination on frankfurters stored at 4 °C in vacuum-packages. **J. Food Protect.**, v. 64, p. 1949-1955, 2001.
2. BROSCH, R.; BUCHRIESER, C.; ROCOURT, J. Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by use of low-frequency-cleavage restriction endonuclease and pulsed-field gel electrophoresis. **Res. Microbiol.**, v. 142, p. 667-675, 1991.
3. COOK, L. V. "USDA/FSIS microbiology laboratory guide-book", 3ed., Revision2, USDA/FSIS, <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgch8.pdf>, 1999.
4. DEL CORRAL, F.; BUCHANAN, R. L.; BENCIVENGO, M. M.; COOKE, P. H. Quantitative comparison of selected virulence associated characteristics in food and clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Protect.**, v. 53, p. 1003-1009, 1990.
5. FAITH, N. G.; YOUSEF, A. E.; LUCHANSKY, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by liquid smoke and isoeugenol, a phenolic component found in smoke. **J. Food Safety**, v. 12, p. 303-314, 1992.
6. FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 476-511, 1991.
7. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION, UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE-FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE, AND CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Draft assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisk1.html>, 2001.

8. GLASS, K. G.; DOYLE, M. P. Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat during refrigerated storage. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p.1565-1569, 1989.
9. GLASS, K. G.; GRANBERG, D. A.; SMITH, A. L.; McNAMARA, A. M.; HARDIN, M.; MATTIAS, J.; LADWIG, K.; JOHNSON, E. A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by sodium diacetate and sodium lactate on wieners and cooked bratwurst. **J. Food Protect.**, v. 65, p. 116-125, 2002.
10. GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 65, p. 55-62, 2001.
11. GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B.; HUNTER, S. B. Subtyping *Listeria monocytogenes*. In: Ryser, E. T. and Marth, E. H. (Ed.) **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcell Dekker. 1999. p. 279-297.
12. HERD, M.; KOCKS, C. Gene fragments distinguishing an epidemic-associated strain from a virulent prototype strain of *Listeria monocytogenes* belong to a distinct functional subset of genes and partially cross-hybridize with other *Listeria* species. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3972-3979, 1992.
13. HOF, H.; ROCOURT, J. Is any strain of *Listeria monocytogenes* detected in a food a healthy risk? **Int. J. Food Microbiol.**, v. 16, p. 173-182, 1992.
14. ISLAM, M.; CHEN, J.; DOYLE, M. P.; CHINAN, M. Control of *Listeria monocytogenes* on turkey frankfurters by generally-recognized-as-safe preservatives. **J. Food Protect.**, v. 65, p. 1411-1416, 2002.
15. JEFFERS, G. T.; BRUCE, J. L.; MCDONOUGH, P. L.; SCARLETT, J.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. **Microbiol.**, v. 147, 1095-1104, 2001.
16. LUCORE, L. A.; SHELHAMMER, T. H.; YOUSEF, A. E. Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A on artificially contaminated frankfurters by high-pressure processing. **J. Food Protect.**, v. 63, p. 662-664, 2000.

17. MACKEY, B. M.; PRITCHET, C.; NORRIS, A.; MEAD, G. C. Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 10, 251-255, 1990.
18. MCKELLAR, R. C.; MOIR, R.; KALAB, M. Factors influencing the survival and growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of Canadian retail wieners. **J. Food Protect.**, v. 57, p. 387-392, 1994.
19. PALUMBO, M. S.; BEERS, S. M.; BHADURI, S.; PALUMBO, S. A. Thermal resistance of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in liquid egg yolk and egg yolk products. **J. Food Protect.**, v. 58, p. 960-966, 1995.
20. PORTO, A. C. S.; FRANCO, B. D. G. M.; SANT'ANNA, E. S.; CALL, J. E.; PIVA, A.; LUCHANSKY, J. B. Viability of a five-strain mixture of *Listeria monocytogenes* in vacuum-sealed packages of frankfurters, commercially prepared with and without 2.0 and 3.0% added potassium lactate, during extended storage at 4 and 10°C. **J. Food Protect.**, v. 65, p. 308-315, 2002.
21. QVIST, S.; SEHESTED, K.; ZEUTHEN, P. Growth suppression of *Listeria monocytogenes* in a meat product. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 24, p. 283-293, 1994.
22. RASCH, M.; KNØCHEL, S. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 27, p. 275-278, 1998.
23. ROCHE, S. M.; VELGE, P.; BOTTREAU, E.; DURIER, C.; MARQUET-VAN DER MEE, N.; PARDON, P. Assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque-forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 63, p. 33-44, 2001.
24. SAMELIS, J., BEDIE, G. K; SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SCANGA, J. A.; SMITH, J. C. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials after postprocess contamination and extended storage of frankfurters at 4°C in vacuum packages. **J. Food Protect.**, v. 65, p. 299-307, 2002.
25. YOUSEF, A. E., LUCHANSKY, J. B.; DEGNAN, A. J.; DOYLE, M. P. Behavior of *Listeria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus*

*acidlactici* H or pediocin AcH during storage at 4 or 25 degrees C. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 1461-1467, 1991.

**EFEITO DA TEMPERATURA DE REAQUECIMENTO NA SOBREVIVÊNCIA DE DE  
*LISTERIA MONOCYTOGENES* EM SALSICHAS EMBALADAS A VÁCUO,  
FORMULADAS COM E SEM A ADIÇÃO DE 2,0% DE LACTATO DE POTÁSSIO,  
DURANTE ESTOCAGEM -18 °C E 4 °C**

## 6.1 TÍTULO:

Effect of re-heating on viability of a five-strain mixture of *Listeria monocytogenes* in vacuum-sealed packages of frankfurters formulated with and without 2.0% added potassium lactate, following refrigerated or frozen storage\*

PORTO, A. C. S.; CALL, J. E.; LUCHANSKY, J. B. Trabalho submetido ao **Journal Food Protection**.

\* Trabalho parcial apresentado no 89<sup>o</sup> Annual Meeting International Association of Food Protection, San Diego, California, USA, June 30-July 03, 2002 (PORTO et al., 2002).

## 6.2 RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi verificar a preferência dos consumidores em relação à estocagem e ao reaquecimento de salsichas e usar essa informação para investigar os efeitos da formulação do produto e da temperatura e tempo de reaquecimento na sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em salsichas embaladas a vácuo, com ou sem adição de lactato de potássio, durante estocagem em temperaturas de refrigeração e congelamento. Salsichas foram inoculadas com aproximadamente de  $8,0 \log_{10}$  CFU por embalagem, com uma mistura de cinco cepas do patógeno. As embalagens foram seladas a vácuo e estocadas a 4 e -18 °C. Em seguida, salsichas foram aquecidas a uma temperatura de superfície de 60, 70, 80 ou 90 °C nos dias 3 e 15 a 4 °C e no dia 30 a -18 °C por submersão completa da embalagem em banho de água termostaticamente controlado. Sobreviventes foram recuperados e enumerados por enxágüe de cada embalagem com água peptonada estéril e semeadura em superfície emágar seletivo MOX. Durante estocagem a 4 °C, os valores D obtidos a 60, 70, 80 e 90 °C foram 2,53, 0,60, 0,22 e 0,14 e 2,51, 0,50, 0,18, e 0,14 minutos, respectivamente, para salsichas contendo lactato de potássio como ingrediente após 3 e 15 dias de estocagem, antes do reaquecimento, respectivamente. Para salsichas formuladas sem o aditivo, os valores D foram 2,44, 0,42, 0,14 e 0,13 e 1,82, 0,42, 0,12 e 0,12, respectivamente, após 3 e 15 dias de estocagem, antes do reaquecimento, respectivamente. Durante estocagem a -18 °C, os valores D obtidos a 60, 70, 80 e 90 °C foram 2,79, 0,59, 0,17 e 0,12 minutos, respectivamente, para salsichas formuladas com a adição de lactato de potássio após 30 dias de estocagem antes do reaquecimento. Para aquelas formuladas sem o aditivo, os valores D foram 1,52, 0,33, 0,13 e 0,12 após estocagem a -18 °C. Análises estatísticas revelaram que os valores D a 60 ou 70 °C diferiram estatisticamente ( $P < 0,05$ ) dos valores D observados à temperatura de reaquecimento superior a 80 °C. O valor z variou de 3,64 a 4,39 °C para salsichas formuladas com lactato de potássio, e 3,51 a 3,87 °C para salsichas formuladas sem a adição de lactato de potássio. Os dados também revelaram que uma redução de 5 unidades logarítmicas foi alcançada em 20 segundos, a 80 ou 90 °C, independentemente das condições de estocagem e formulação. Portanto, diante dos resultados deste trabalho, o reaquecimento de salsichas antes do consumo deveria ser estabelecido como norma para a redução de casos de listeriose.

**Palavras-chave:** *L. monocytogenes*; isolamento; salsichas; aquecimento; patógeno; carne; microbiologia de alimentos.

### 6.3 ABSTRACT

The purpose of this study was to assess consumer preferences for storing and re-heating frankfurters and then to use this information to assess the effect of product formulation and storage times and temperatures on the viability of *Listeria monocytogenes* after re-heating of frankfurters. Individual links were inoculated with about  $8.0 \log_{10}$  CFU/package of a five-strain mixture of the pathogen, vacuum sealed, and stored at 4 °C for 3 and 15 days and at –18 °C for 30 days. Frankfurters were heated to a surface temperature of 60 °, 70 °, 80 °, or 90 °C for up to 8 minutes by submersing the packages in a thermostatically-controlled circulating water bath. Survivors were recovered and enumerated by rinsing the contents of each package with sterile peptone water and direct plating onto MOX selective agar plates. For frankfurters containing potassium lactate as an ingredient, the D-values at 60 °, 70 °, 80 °, and 90 °C were 2.53, 0.60, 0.22 min, and 0.14 and 2.51, 0.50, 0.18, and 0.14 min after storage for 3 and 15 days, respectively, at 4 °C prior to re-heating. After storage at – 18 °C for 30 days prior to re-heating, the D-values at 60\_, 70\_, 80\_, and 90\_C were 2.79, 0.59, 0.17, and 0.12 min, respectively. For frankfurters prepared without potassium lactate, the D-values at 60 °, 70 °, 80 °, and 90 °C were 2.44, 0.42, 0.14, and 0.13 and 1.82, 0.42, 0.12, and 0.12 after storage for 3 and 15 days, respectively, at 4 °C prior to re-heating. After storage at – 18 °C for 30 days prior to re-heating, the D-values at 60 °, 70 °, 80 °, and 90 °C were 1.52, 0.33, 0.13, and 0.12 min, respectively. Statistical analyses revealed that the D-values obtained at 60 ° and 70 °C were significantly ( $p < 0.05$ ) different from the D-values obtained at 80 ° and 90 °C. In general, the results revealed that a 5- $\log_{10}$  unit reduction was achieved within 20 seconds at 80 ° or 90 °C regardless of storage conditions or formulation. In fact, product formulation did not appreciably affect D-values for any of the parameters tested. These findings establish re-heating guidelines that can be followed by consumers to ensure that frankfurters, which may become contaminated with low levels of *L. monocytogenes* after unpackaging, are adequately re-heated prior to consumption.

**Key words:** *L. monocytogenes*, recovery, frankfurters, heating, pathogen, retail survey, meat, food safety.

## 6.4 INTRODUÇÃO

*L. monocytogenes* é um microrganismo patogênico de considerável importância para a saúde pública mundial, passível de crescimento em temperatura de refrigeração e um dos microrganismos mais termotolerantes (HANSEL; KNOCHEL, 2001). O United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS) apontou *L. monocytogenes* como responsável por 50% (31 de 62) dos *recalls* para produtos cárneos prontos para consumo (FSIS/USDA, 2001). Apesar de o processamento térmico de salsichas ser suficiente para eliminar *L. monocytogenes* que pode estar naturalmente presente nas emulsões de salsichas antes do processamento (ZAIKA et al., 1990), o patógeno pode ser detectado no produto final ante eventual deficiência no processo de aquecimento e/ou por pós-contaminação (McKELLAR et al., 1994; WENGER et al., 1990; YOUSEF, 1991). O risco de pós-contaminação também pode ocorrer no refrigerador do consumidor pelo contato com outros alimentos que dispensam reaquecimento antes do consumo (WANG; MURIANA, 1994). Considerando que nos Estados Unidos sete bilhões de salsichas são consumidas durante o verão, atingindo 20 bilhões de unidades por ano (BRAND, 1999), e que o patógeno tem sido associado a surtos/casos de listeriose, diversas pesquisas vêm sendo conduzidas objetivando desenvolver estratégias para diminuir o risco de listeriose decorrente do consumo desses produtos.

A adição de compostos antimicrobianos na formulação e baixa temperatura de estocagem são práticas eficazes para retardar a multiplicação de *L. monocytogenes* (BEDIE et al., 2001, PORTO et al., 2002a; PORTO et al., 2002b), entretanto nenhuma dessas barreiras é capaz de eliminar ou reduzir a população do patógeno do produto em caso de pós-contaminação. Para esse fim, um dos métodos mais comuns e eficazes para reduzir a população de *L. monocytogenes* em alimentos consiste na aplicação de calor. Apesar de a salsicha ser um produto pronto para consumo, uma enquete com consumidores da American Meat Institute Foundation (AMIF) avaliando o comportamento da manipulação e reaquecimento de salsichas pelo consumidor revelou que 72% (720 de 1.000) dos entrevistados

sempre reaquecem o produto antes do consumo (BEERS, 2001). Contudo, 15% (150 de 1.000) consomem o produto diretamente da embalagem, e 11% (110 de 1.000) admitem que pelo menos uma pessoa da mesma residência consome o produto sem reaquecimento. De acordo com dados do FDA/USDA, *L. monocytogenes* Risk Assessment (2001), o tempo de estocagem após aquisição do produto é de cinco a sete dias, mas um estudo conduzido pelo FSIS mostrou que 4,1% (3 de 73) dos consumidores estocam o produto por 21 dias, e 4,1% (3 de 73), por 30 dias. Em outro estudo do FSIS, um dos consumidores respondeu que mantém salsichas durante 90 dias e outro por 180 dias, dos 136 que responderam à enquete (FDA/USDA, 2001).

Durante o surto interestadual de listeriose envolvendo o consumo de salsichas em 1998, 89% (16 de 18) dos pacientes e 32% (6 de 19) dos pacientes-controle reaqueceram o produto durante o mês anterior aos casos da doença (CDCP, 1998). Baseado no pressuposto de que 1% a 14% das salsichas não são adequadamente reaquecidas antes do consumo, de acordo com o United States Department of Health and Human Service Food and Drug Administration's Center for Food Safety and Applied Nutrition (DHHS/FDA/CFSAN), em colaboração com o USDA/FSIS em consulta com o Centers for Disease Control and Prevention (CDCP), esse tipo de produto cárneo pronto para consumo possui um alto risco de causar listeriose nos Estados Unidos (FDA/USDA, 2001).

Poucos estudos têm sido realizados para verificar a influência dos efeitos da formulação do produto e/ou temperatura e tempo de estocagem, no subsequente tempo e temperatura de reaquecimento e na sobrevivência de *L. monocytogenes* em salsichas. Esses dados podem ser úteis para estabelecer estratégias de reaquecimento visando a assegurar a qualidade microbiológica de salsichas no momento do consumo. Um dos objetivos do trabalho foi verificar a preferência dos consumidores em relação à estocagem e ao reaquecimento de salsichas. O outro objetivo foi usar essa informação para investigar os efeitos da temperatura e do tempo de reaquecimento na sobrevivência de uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes* em salsichas embaladas a vácuo, com ou sem adição de lactato de potássio, durante estocagem em temperaturas de refrigeração e congelamento.

## 6.5 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.5.1 Preparo das cepas

Como descrito previamente (item 3. 5. 1), células na fase estacionária de uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes* [Scott A (sorotipo 4b; isolado clínico), H7776 (sorotipo 4b, isolado de salsicha), LM-101 M (sorotipo 4b; isolado de salame de carne bovina e suína), F6854 (sorotipo 1/2a, isolado de salsicha de carne de peru), e MFS-2 (sorotipo 1/2a, isolado de planta de processamento de suínos) foram utilizadas para inocular salsichas, posteriormente embaladas a vácuo. As culturas-estoque foram mantidas em caldo infusão cérebro coração (BHI; Difco Laboratories Inc., Detroit, Michigan), adicionado de 20% (p/v) de glicerol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), e congeladas em alíquotas de 1,5 ml em tubos criogênicos mantidos a -80 °C.

### 6.5.2 Preparo e inoculação das salsichas embaladas a vácuo

Salsichas de carne suína e bovina sem pele (aproximadamente 56 g/salsicha) embaladas a vácuo (aproximadamente 456 g/pacote) foram obtidas em uma planta de processamento em Philadelphia, PA, USA. Duas formulações de salsichas de carne suína e bovina foram testadas: uma formulação contendo lactato de potássio (Purac America, Inc., Lincolnshire, IL) a uma concentração final de 2,0% adicionada na emulsão de salsichas e outra não contendo o aditivo. As salsichas foram removidas assepticamente da embalagem original e reembaladas individualmente em sacos de nylon-polietileno (barreira padrão 3 Mil; 20,3 x 30,5 cm;  $O_2 < 0,6 \text{ cm}^3/650 \text{ cm}^2$  por 24 h a 0 °C umidade relativa com faixa de transmissão de umidade a vapor de 0,6 gramas de  $H_2O$  por  $650 \text{ cm}^2$  por 24 h a 38 °C; Koch Industries, Kansas City, MO). Cada embalagem foi inoculada com 1 ml da suspensão da mistura de cinco cepas *L. monocytogenes*, diluída o necessário, em água peptonada a 0,1%, para atingir um inóculo de aproximadamente de  $8,0 \log_{10}$  UFC por embalagem, que continham números aproximados de cada uma das cinco cepas. As

embalagens foram massageadas manualmente visando à distribuição do inóculo e, em seguida, seladas utilizando-se uma embaladora a vácuo Multivac A300/16 a 100 kPa (Sepp Haggemüller KG, Wolfertschwenden, Alemanha) e incubadas a 4 °C por 3 e 15 dias, ou a -18 °C após 30 dias antes do reaquecimento. Embalagens não inoculadas, tratamento-controle negativo, foram inoculadas com 1 ml de água peptonada a 0,1%, que foram analisadas após 3 e 15 dias a 4 °C e após 30 dias a -18 °C. As embalagens do controle positivo, que foram inoculadas com o patógeno mas não reaquecidas, também foram analisadas após 3 e 15 dias a 4 °C e após 30 dias a -18 °C. Todos os experimentos foram realizados em três repetições, e, para cada repetição, três embalagens foram analisadas por intervalo de amostragem para cada tratamento. Os resultados são as médias das três repetições.

### 6.5.3 Tratamento Térmico

Após o período de estocagem, cada embalagem foi aberta assepticamente, e um termopar (tipo J, Omega Engineering Inc., Stamford, CT, USA) foi anexado à superfície (aproximadamente 1 a 2 mm) das extremidades de cada salsicha. Em seguida, as embalagens foram novamente seladas a quente a 100 kPa, como descrito previamente. As embalagens estocadas a -18 °C foram descongeladas durante  $18 \pm 2$  horas a 4 °C antes de serem analisadas. Três embalagens foram testadas a cada intervalo de amostragem por submersão completa da embalagem em banho de água termostaticamente controlado (Exacal-251HT, Neslab Instruments Inc., Newington, NH, USA) e aquecidas a uma temperatura de superfície de 60 °C (140 °F) por 2, 4, 6 e 8 minutos, ou a 70 °C (158 °F) por 0,75, 1,5, 2 e 3 minutos ou a 80 °C (176 °F) ou 90 °C (194 °F) por 0,25, 0,5, 0,75 e 1 minuto. Os sacos foram movidos para frente e para trás manualmente no banho de água durante os primeiros 30 segundos para distribuição homogênea do calor e para alcançar rapidamente as temperaturas-teste. A temperatura das amostras foi monitorada e anotada utilizando-se um software *datalogger* (National Instruments, Austin, TX). Nos intervalos pré-estabelecidos, as amostras foram removidas do

banho de água, resfriadas imediatamente com banho de gelo, e estocadas a 4 °C por até três horas antes de serem analisadas.

#### 6.5.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo programa SAS versão 8.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Os tempos de redução decimal ou valores D foram calculados por análise de regressão linear do  $\log_{10}$  UFC *versus* tempo (minuto) para cada uma das 24 combinações dos tratamentos ou formulação (0% *versus* 2% de lactato de potássio), condições de estocagem (4°C *versus* -18°C), e temperaturas de aquecimento (60, 70, 80 e 90 °C). Os valores z foram obtidos por regressão linear da plotagem de  $\log_{10}$  dos valores D contra cada uma das temperaturas testadas. Os valores D e z calculados para cada condição experimental foram avaliados usando o teste de comparação pareada baseado em erro (*pool* do erro padrão).

#### 6.5.5 Análises microbiológicas

Em cada dia de amostragem, cada embalagem foi higienizada com papel toalha embebido em etanol a 70% (v/v) e aberta assepticamente com o uso de tesoura esterilizada. Dezenove mililitros de água peptonada a 0,1% foram adicionados em cada embalagem, as quais foram massageadas manualmente por dois minutos, e o fluido resultante (aproximadamente 20 ml) foi transferido assepticamente para um tubo cônico de centrifuga de 50 ml estéril com auxílio de uma pipeta. O patógeno foi enumerado por semeadura em superfície, inoculando 250  $\mu$ l do fluido resultante ou diluições em placas de ágar Oxford modificado (MOX) utilizando-se um plaqueador espiral automático Autoplate 4000 (Spiral Biotech, Gaithersburg, MD). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e as colônias típicas de *Listeriae* forma contadas manualmente e confirmadas pelo procedimento aprovado do USDA/FSIS (COOK, 1999). A contagem foi expressa em  $\log_{10}$  unidades formadoras de colônia (UFC) por embalagem. Além do da enumeração por

semeadura em superfície, as células sobreviventes foram recuperadas pelo método de enriquecimento do USDA/FSIS (COOK, 1999). Em algumas instâncias, *L. monocytogenes* foi também recuperada como a seguir: 10 ml do fluido resultante foi transferido para 90 ml de caldo Universidade de Vermont I (UVM I) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) e incubado por  $22 \pm 2$  h a  $30$  °C. Uma alíquota de 0,1 ml de caldo de enriquecimento primário UVM I foi inoculada em tubos de 10 ml contendo caldo de enriquecimento secundário Fraser (Oxoid) e incubadas a  $37$  °C por  $27 \pm 1$  h. Após o período de incubação, uma alíquota de 0,2 ml de caldo Fraser foi semeada por esgotamento em ágar Oxford modificado e incubada a  $37$  °C por 48 h (COOK, 1999).

## 6.6 RESULTADOS

### 6.6.1 Enquete sobre a estocagem e preparo de salsichas em casa

Um questionário informal e não-randomizado foi aplicado para se obter uma preferência do consumidor quanto à estocagem e a forma de reaquecimento de salsichas. Um total de 182 indivíduos responderam pelo menos uma de nove questões que formaram o questionário (Tabela 6). A maioria das questões era de múltipla escolha, e o número de respostas variou dependendo da questão. Apesar de todas as respostas terem sido interessantes e úteis para o objetivo deste trabalho, as mais relevantes foram: i) que somente 47 de 162 (29%) indivíduos consideraram o produto como pronto para consumo; ii) que indivíduos estocam salsichas em casa tanto sob refrigeração (47%, 111 de 238 respostas) quanto em freezer (53%, 127 de 238 respostas); e iii) que indivíduos preferem ferver (33%, 93 de 278), do que grelhar (31%, 85 de 278) aquecer em microondas (19%, 53 de 278) ou fritar (13%, 37 de 278) o produto. Com base nessas respostas, experimento foi conduzido para estocar salsichas embaladas a vácuo que foram contaminadas com *L. monocytogenes* sob temperatura de refrigeração ou congelamento e, então, para reaquecer essas salsichas em temperaturas próximas à ebulição.

### 6.6.2 Efeito da temperatura de estocagem na sobrevivência de *L. monocytogenes* em salsichas embaladas a vácuo

Foi determinada a sobrevivência de *L. monocytogenes* após a estocagem de 3 ou 15 dias a 4 °C ou estocagem por 30 dias a -18 °C. Em geral, os números do patógeno permaneceram constantes após um mês de estocagem sob temperatura de congelamento em relação à formulação. A 4 °C, os números do patógeno permaneceram constante quando o produto foi formulado com lactato de potássio, enquanto, na ausência desse aditivo, os números do patógeno aumentaram ligeiramente, cerca de 0,58 log<sub>10</sub> UFC por embalagem. O tratamento controle negativo (não inoculado) apresentou resultado negativo para a presença do patógeno tanto por semeadura em superfície (< 20 UFC/embalagem) quanto pelo método de enriquecimento.

TABELA 6. Entrevista informal com consumidores sobre as práticas de preparo e estocagem de salsichas em casa.

---

1) Você considera salsichas como um produto cárneo pronto para consumo ou um produto que requer aquecimento?

Dos 162 entrevistados, 71% (115 de 162) consideram salsichas como um produto que requer aquecimento antes do consumo, enquanto 29% consideram o produto como pronto para o consumo.

---

2) Qual a frequência com que você consome salsichas?

De 181 entrevistados, 97 (53,6%) comem salsichas mensalmente, 50 (27,6%) comem semanalmente, e somente 4 (2,2%) indicaram que comem diariamente. Outros entrevistados responderam em diferentes categorias.

---

3) Quantas salsichas você consome por refeição?

Dos 174 entrevistados, 160 (92%) indicaram que eles consomem de uma a duas salsichas por refeição, enquanto 8% (14 de 174) dos entrevistados consomem de três a quatro salsichas por refeição. Nenhum dos entrevistados respondeu que consome mais de quatro salsichas por refeição.

---

4) Que tipo de salsicha você consome?

Dos 202 entrevistados, 30% (61 de 202) indicaram que comem somente salsichas de carne bovina, enquanto 15% (30 de 202) comem somente salsichas de carne suína, e 41% (83 de 202) indicaram que comem tanto salsichas de carne bovina como suína. Dos indivíduos restantes, 5% dos indivíduos indicaram que consomem salsichas de peru e 3% de frango.

---

Continuação da Tabela 6 ...

---

5) Você costuma olhar o rótulo da embalagem?

Dos 174 entrevistados, a maioria (61%) respondeu que olha o rótulo da embalagem. Dos que verificam o rótulo, 21% indicaram que verificam o conteúdo de gordura, 14% os ingredientes, 14% o tipo de carne, 12,7% a marca, 11,5% o conteúdo de cloreto de sódio e 9,7% a data de validade. Todos os outros códigos mostraram porcentagens menores do que 3%.

---

6) Como você estoca o produto?

Dos 278 entrevistados, não houve diferença significativa na preferência de estocagem, com 53% dos respondentes indicando que preferem freezer em relação a refrigerador (47%).

---

7) Por quanto tempo você estoca o produto?

Dos 108 entrevistados que estocam o produto em refrigerador, 37% (40 de 108) dos indivíduos estocam o produto por uma ou duas semanas, e 34% (37 de 108) estocam de três a sete dias. Dos 126 entrevistados que estocam o produtos em freezer, 42 (33%) estocam o produto por mais de 45 dias, com 30 (24%) estocando salsichas por 30 a 45 dias, 27 (21%) estocando salsichas por 21 a 30 dias, 14 (11%) estocando salsichas de 15 a 20 dias, e 13 (10%) estocando de uma a duas semanas o produto em freezer.

---

8) Em caso de estocar o produto em freezer, como você descongela antes do consumo?

Dos 150 entrevistados, não houve diferença significativa na proporção daqueles que descongelam (43%) *versus* aos que não descongelam (57%). Dos 63 entrevistados, 41% descongelam em refrigerador, 37% descongelam em microondas, e 16% descongelam na pia.

---

9) Como você prepara a salsicha antes do consumo?

Dos 180 entrevistados, 97,2% (175 de 180) preparam o produto com algum tipo de aquecimento antes do consumo, porcentagem significativamente maior do que os 2,8% que consomem o produto sem nenhum um tipo de reaquecimento. Das 278 respostas sobre o tipo de aquecimento, 85 (30,6%) grelham; 53 (19%) usam microondas; 47 (17%) responderam que aquecem adicionando as salsichas à água e, então, fervem; 46 (17%) responderam que fervem a água e depois adicionam o produto, e 37 (13%) dos indivíduos fritam o produto antes do consumo.

---

### **6.6.3 Efeito da temperatura de reaquecimento na sobrevivência de *L. monocytogenes* em salsichas embaladas a vácuo e estocadas a -18 °C ou 4 °C**

Em intervalos preestabelecidos, seguidos de estocagem em temperatura de refrigeração ou congelamento, embalagens seladas a vácuo inoculadas com o patógeno foram completamente submergidas em banho de água termostaticamente controlado mantido a 60, 70, 80 ou 90 °C por até 8 minutos. Como esperado, os valores D e z diminuíram com o aumento da temperatura de reaquecimento (Tabela 7).

Tabela 7. Tempo de redução decimal (valor D) e valor z para uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes* em salsichas formuladas com e sem adição de lactato de potássio e estocadas a 4 ou -18 °C.

Formulação	Condições de estocagem	Valor D (min) <sup>1</sup>				Valor z (°C)
		60 °C <sup>2</sup>	70 °C	80 °C	90 °C	
0 % Lack <sup>5</sup>	4 °C /3 dias	2,44 <sup>a,3</sup> ± 0,94 <sup>4</sup>	0,42 <sup>b</sup> ± 0,10	0,14 <sup>c</sup> ± 0,03	0,13 <sup>c</sup> ± 0,03	3,87 <sup>d</sup> ± 0,78
	4 °C /15 dias	1,82 <sup>a</sup> ± 0,53	0,42 <sup>b</sup> ± 0,10	0,12 <sup>c</sup> ± 0,03	0,12 <sup>c</sup> ± 0,03	3,51 <sup>d</sup> ± 0,64
	-18 °C /30dias	1,52 <sup>a</sup> ± 0,37	0,33 <sup>b</sup> ± 0,06	0,13 <sup>c</sup> ± 0,03	0,12 <sup>c</sup> ± 0,03	3,65 <sup>d</sup> ± 0,69
2 % Lack <sup>5</sup>	4 °C /3 dias	2,53 <sup>a</sup> ± 1,02	0,60 <sup>b</sup> ± 0,21	0,22 <sup>c</sup> ± 0,07	0,14 <sup>c</sup> ± 0,03	4,39 <sup>d</sup> ± 1,00
	4 °C /15 dias	2,51 <sup>a</sup> ± 1,00	0,50 <sup>b</sup> ± 0,14	0,18 <sup>c</sup> ± 0,05	0,14 <sup>c</sup> ± 0,03	4,27 <sup>d</sup> ± 0,95
	-18 °C /30dias	2,79 <sup>a,6</sup> ± 1,51	0,59 <sup>b,6</sup> ± 0,22	0,17 <sup>c,6</sup> ± 0,05	0,12 <sup>c,6</sup> ± 0,03	3,64 <sup>d</sup> ± 0,69

<sup>1</sup> Valores médios de três repetições

<sup>2</sup> Temperatura de reaquecimento

<sup>3</sup> Valores das colunas sem nenhuma letra em comum são significativamente diferentes (P < 0,05)

<sup>4</sup> Desvio padrão

<sup>5</sup> Lactato de potássio

<sup>6</sup> Valores médios de duas repetições

A população sobrevivente de *L. monocytogenes* para cada intervalo de tempo e para cada temperatura de reaquecimento é mostrada na Figura 5. Esse gráfico mostra uma média do número da população sobrevivente para cada uma das duas formulações e condições de estocagem para cada uma das quatro temperaturas de reaquecimento. O gráfico mostra que reaquecer a superfície das salsichas a 70 °C por pelo menos 2 minutos, ou 80 ou 90 °C por pelo menos 0,6 minutos, é suficiente para alcançar uma redução de cinco ciclos logarítmicos do patógeno em salsichas formuladas com ou sem lactato de potássio e estocadas tanto a 4 quanto a -18 °C. Esses dados também demonstram que os números do patógeno diminuíram com a elevação da temperatura independente da formulação do produto ou condições de estocagem.

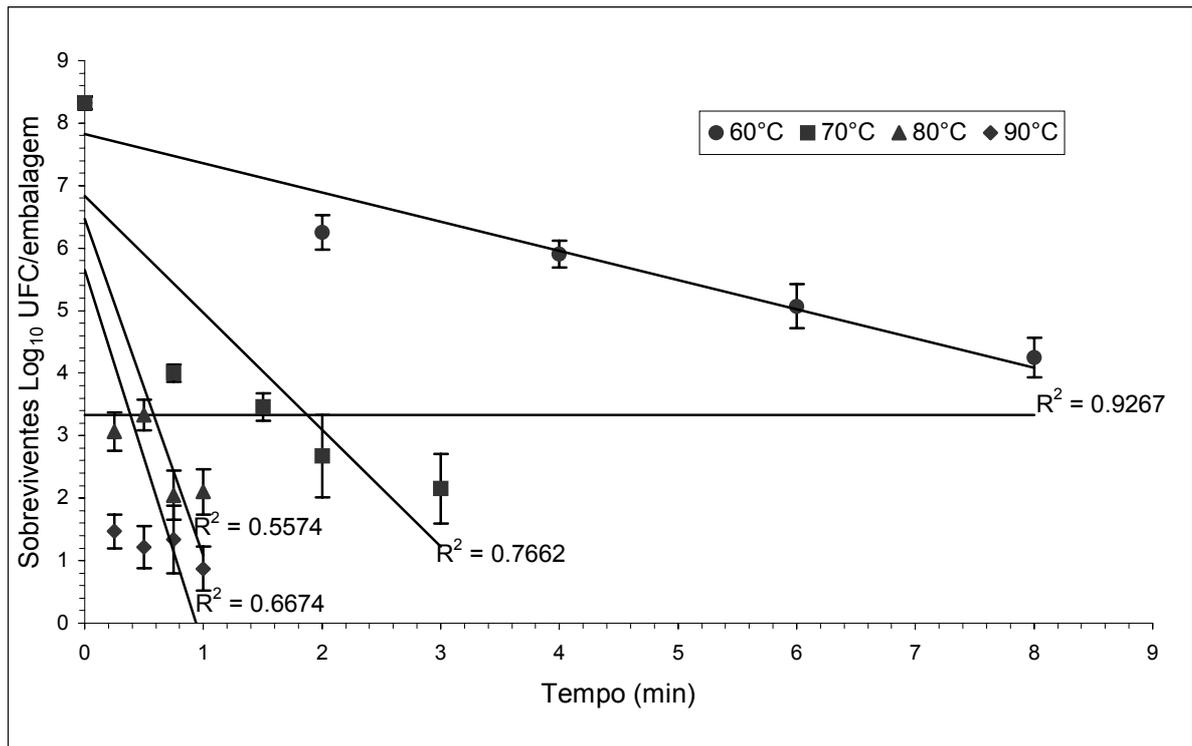


Figura 5. Inativação térmica de uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes* em salsichas embaladas a vácuo. Dados são a composição de três repetições do número de sobreviventes isolados seguido de aquecimento a 60 °C (■), 70 °C (●), 80 °C (▲) ou 90 °C (□) em salsichas preparadas com e sem 2% de lactato de potássio e estocadas a 4 e -18 °C. Barras verticais representam +/- erro padrão.

## 6.7 DISCUSSÃO

Infecções causadas por *L. monocytogenes* resultam em altas taxas de hospitalização, mais do que qualquer outro patógeno em alimentos, e causam quase metade do total de mortes relatadas com infecção alimentar (DONELLY, 2001). Apesar de os esforços de prevenção empreendidos pelas indústrias de alimentos, incluindo a estratégia de tolerância zero para produtos cárneos prontos para consumo estabelecida pelas agências de governo nos Estados Unidos, em 1999, plantas de processamento de salsichas e carnes de *delicatessen* foram

responsáveis pelo *recall* de mais 250.000 quilos de produtos com possível contaminação de *L. monocytogenes* (FSIS/USDA, 2001).

Estudos mostram que a adição de determinados componentes antimicrobianos (BEDIE et al., 2001; PORTO et al., 2002a; PORTO et al., 2002b; SHELEF e YANG, 1991) em formulação de produtos cárneos prontos para consumo pode inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* durante estocagem prolongada em refrigeração. Além disso, a inclusão de conservantes ou outros compostos em carnes processadas pode afetar a resistência térmica de *L. monocytogenes* (DOYLE et al., 2001). Contudo, nossos dados revelaram que os valores D e z obtidos para uma mistura de cinco cepas do patógeno em salsichas formuladas com adição de 2% de lactato de potássio não foram significativamente ( $P \geq 0,05$ ) diferentes dos valores D e z observados em salsichas formuladas sem o aditivo. Logo, a adição de 2% de lactato de potássio não preservou *L. monocytogenes* dos danos causados pelo calor durante o reaquecimento de salsichas.

YEN et al. (1991) não observaram efeito de proteção do nitrito de sódio e eritorbato de sódio na destruição térmica de *L. monocytogenes* em carne suína moída, entretanto observaram uma proteção causada pela adição de cloreto de sódio, dextrose e uma mistura de fosfato. Samelis et al. (2002) verificaram que pasteurização pós-empacotamento em salsichas não inibiu o patógeno, mas retardou a multiplicação de *L. monocytogenes* no tratamento de menor concentração de lactato de sódio, que era de 1,8%. Pesquisas comparativas como as acima citadas sugerem que a condução de estudos em embalagens inoculadas são consistentes e quantitativas para estabelecer a resistência térmica ou sobrevivência do patógeno em determinado produto (MURPHY et al., 2000).

Os valores D reportados nessa investigação estão, em geral, de acordo com valores D previamente demonstrados para *L. monocytogenes* em outros estudos. Por exemplo, Boyle et al. (1990) relataram um valor D de 2,54 e 0,23 minutos a 60 e 70 °C para emulsão de carne, respectivamente. Roering et al. (1998), avaliando pasteurização pós-processamento em salame, observaram valores D de 2,8, 0,84, 0,37 e 0,28 minutos a 65,6, 77,6, 87,8 e 98,9 °C, respectivamente. Murphy et al. (1999), estudando a sobrevivência de *Listeriae* em carne de peito de frango moída

durante inativação térmica, obtiveram valores D de 0,394 e 0,133 minutos a 67,5 e 70 °C, respectivamente. Muriana et al. (2002) investigaram o efeito da pasteurização pós-empacotamento por submersão de uma variedade de produtos cárneos de *delicatessen* prontos para consumo e reportaram valores D de 6,9, 1,6, e 1,1 minutos a 62,8 °C, e 0,16, 0,06 e 0,09 a 71,1 °C para carne de peru defumada, *roast beef* e presunto defumado, respectivamente. Por fim, Taormina e Beuchat (2002) relataram valores D que variaram de 2,98 a 1,94 minutos a 59 °C e, de 0,97 a 0,84 minutos a 62 °C para *L. monocytogenes* estressada em meio alcalino em exudatos de salsichas.

As diferenças na termorresistência do patógeno mostradas neste trabalho em relação a estudos anteriores podem ser justificadas pela diferença nas cepas utilizadas ou seus estados fisiológicos, e/ou se o inóculo foi aplicado na superfície da salsicha ou distribuído na emulsão. Diferenças nos valores D de *L. monocytogenes* entre vários estudos também podem ser atribuídas a diferenças na composição centesimal dos produtos testados, no tempo necessário para o produto alcançar a temperatura-teste, na pré-exposição de células a choque térmico ou ácido, ou outros estresses, e/ou no meio de cultura e condições de incubação usadas (DOYLE et al., 2001; JUNEJA, 2002; POYSKY et al., 1997; ROERING et al., 1998). Os valores z apresentaram-se dentro da faixa observada em estudos prévios. Como um exemplo, Bolton et al. (2000) relataram valores entre 4,2 e 5,9 °C em *sous vide* e em produtos de carne bovina moída, respectivamente. Mazzota e Gombas (2001) observaram valores de 5,6 e 5,9 °C em emulsão de salsichas para células em fase estacionária de várias cepas de *L. monocytogenes*.

Diversos estudos têm mostrado a capacidade de *L. monocytogenes* multiplicar-se e/ou de sobreviver em salsichas embaladas a vácuo durante estocagem prolongada sob refrigeração ou congelamento. No presente trabalho, foi observada a sobrevivência de uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes* a 4 °C por 3 e 15 dias, e a -18 °C por 30 dias, respectivamente. Esses dados estão em consonância com os resultados obtidos por Taormina e Beuchat (2002), que mostraram que os números do patógeno não alteraram significativamente em salsichas estocadas a -20 °C por 12 semanas. Apesar de os números do patógeno

não aumentarem durante a estocagem em freezer, pode ocorrer drástico aumento sob descongelamento seguido de estocagem em refrigeração. Assume-se que a contaminação natural de salsichas com *L. monocytogenes* é geralmente < 1.000 UFC por grama (FARBER; PETERKIN, 1999) e que, sendo assim, uma redução de 5 ciclo logarítmicos em conseqüência do processo de reaquecimento antes do consumo seria suficiente para assegurar a exclusão de *L. monocytogenes* em salsichas.

Em resumo, a enquete informal com consumidores revelou, um tanto quanto surpreendentemente, que a maioria dos indivíduos consideraram salsichas como um produto cárneo que requer aquecimento antes do consumo e que a maioria aquece por cozimento em água em ebulição. Nesse sentido, é significativo que uma redução de 5 ciclos logarítmicos seja alcançada em 36 segundos por reaquecimento do produto em temperaturas próximas à temperatura de ebulição. Por último, estes dados revelaram que a formulação do produto e temperatura/tempo de estocagem, ou combinações destas, não influenciaram significativamente a sobrevivência e/ou inativação térmica de *L. monocytogenes* em salsichas nas temperaturas de reaquecimento testadas. Portanto, diante dos resultados deste trabalho, o reaquecimento de salsichas antes do consumo deveria ser estabelecido como norma para a redução de casos de listeriose.

#### AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer as seguintes pessoas, que contribuíram significativamente para a conclusão deste estudo, dividindo seus talentos, recursos, tempo e/ou opiniões: Omua Ahonkhai, Caitriona Byrne, Elaan Camper, Jerry Crawford, Brian Dirks, Marcus Handy, Nelly Osario, John Phillips, Peggy Williamson e Laura Wonderling, e todos do Eastern Regional Research Center, bem como Randy Huffman (American Meat Institute Foundation), Karen Hulebak (USDA/FSIS), Joe Meyer (Kraft Foods) e Alan Oser e Lisa Yoder (Hatfield Quality Meats).

## 6.8 REFERÊNCIAS

1. BEDIE, G. K.; SAMELIS, J.; SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SCANGA, J. A.; SMITH, G. C. Antimicrobials in the formulation to control *Listeria monocytogenes* postprocessing contamination on frankfurters stored at 4 °C in vacuum-packages. **J. Food Protect.**, v. 64, p.1949-1955, 2001.
2. BEERS, A. Consumers eat unheated hot dogs, according to AMIF data. **Food Chemical News**: n. 2, p. 26, 2001.
3. BOLTON, D. J.; MCMAHON, C. M.; DOHERTY, A. M.; SHERIDAN, J. J.; MCDOWELL, D. A.; BLAIR, I. S.; HARRINGTON, D. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in minced beef under laboratory conditions and in sous-vide prepared minced and solid beef cooked in a commercial retort. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 626-632, 2000.
4. BOYLE, D. L.; SOFOS, J. N.; SCHMIDT, G. R. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in a meat slurry and in ground beef. **J. Food Sci.**, v. 55, p. 327-329, 1990.
5. BRAND, L. A. Hot Dog Days. **Prepared Foods**, p. 59-60, 62, 1999.
6. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreak of listeriosis – United States 1998. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 47, n. 50, p. 1085-1086, 1998.
7. COOK, L. V. "USDA/FSIS microbiology laboratory guide-book," 3<sup>rd</sup> ed., revision2,USDA/FSIS, <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microblab/mlgch8.pdf> 1999.
8. DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutr. Rev.**, v. 59, p. 183-194, 2001.
9. DOYLE, M. E.; MAZZOTA, A. S.; WANG, T.; WISEMAN, D. W.; SCOTT, V. N. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Protect.**, v. 64, p. 410-429, 2001.

10. FARBER, J. M.; PERTERKIN, P. I. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcell Dekker. 1999. p. 505-564.
11. HANSEN, T. B.; KNOCHEL, S. Factors influencing resuscitation and growth of heat injured *Listeria monocytogenes* 13-249 in sous vide cooked beef. **J. Food Microbiol.**, v. 63, p. 135-147, 2001.
12. JUNEJA, V. K. Thermal inactivation of microorganisms. In: JUNEJA, V. K.; SOFOS, J. N. **Control of food borne microorganisms**. New York: Marcell Dekker. 2002. p. 13-53,
13. MAZZOTA, A.; GOMBAS, D. E. Heat resistance of an outbreak strain of *Listeria monocytogenes* in hot dog batter. **J. Food Protect.** v.54, p. 321-324, 2001.
14. MCKELLAR, R. C.; MOIR, R.; KALAB, M. Factors influencing the survival and growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of Canadian retail wieners. **J. Food Protect.**, v. 57, p. 387-392, 1994.
15. MURPHY, R. Y.; MARKS, B. P.; JOHNSON, E. R.; JOHNSON, M. G. Inactivation of *Salmonella* and *Listeria* in ground chicken breast meat during thermal processing. **J. Food Protect.**, v. 62, p. 980-985, 1999.
16. MURPHY, R. Y.; MARKS, B. P.; JOHNSON, E. R.; JOHNSON, M. G. Thermal inactivation kinetics of *Salmonella* and *Listeria* in ground chicken breast meat and liquid medium. **J. Food Sci.**, v. 65, p. 706-710, 2000.
17. PORTO, A. C. S.; FRANCO, B. D. G. M.; SANT'ANNA, E. S.; CALL, J. E.; PIVA, A.; LUCHANSKY, J. B. Viability of a five-strain mixture of *Listeria monocytogenes* in vacuum-sealed packages of frankfurters, commercially prepared with and without 2.0 and 3.0% added potassium lactate, during extended storage at 4 and 10 °C. **J. Food Protect.**, v. 65, p. 308-315, 2002.
18. PORTO, A. C. S.; OSARIO, M.; WILLIAMSON, P.; BYRNE, C.; YODER, L.; CALL, J. E.; LUCHANSKY, J. B. Ability of *Listeria monocytogenes* to withstand re-heating of frankfurters. **Abst. Annu. Mtg. Intl. Assoc. Food Protect.** (P171), p.102, 2002.

19. POYSKY, F. T.; PARANJPYE, R. N.; PETERSON, M. E.; PELROY, G. A.; GUTTMAN, A. E.; EKLUND, M. W. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on hot-smoked salmon by the interaction of heat and smoke or liquid smoke. **J. Food Protect.**, v. 60, p. 649-654, 1997.
20. ROERING, A. M.; WIERZBA, R. K.; IHNOT, A. M.; LUCHANSKY, J. B. 1998. Pasteurization of vacuum-sealed packages of summer sausage inoculated with *Listeria monocytogenes*. **J. Food Safety**, v. 18, p. 49-56, 1998.
21. SAMELIS, J.; BEDIE, G. K.; SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SCANGA, J. A.; SMITH, G. C. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials after postprocess contamination and extended storage of frankfurters at 4°C in vacuum-packages. **J. Food Protect.**, v. 65, p. 299-307, 2002
22. SHELEF, L. A.; YANG, Q. Growth suppression of *Listeria monocytogenes* by lactates in broth, chicken, and beef. **J. Food Protect.**, v. 54, p. 283-287, 1991.
23. TAORMINA, P. J.; BEUCHAT, L. R. Survival and growth of alkali-stressed *Listeria monocytogenes* on beef frankfurters and thermotolerance in frankfurter exudates. **J. Food Protect.**, v. 65, p. 291-298, 2002.
24. TAPPERO, J.; SCHUCHAT, A.; DEEVER, K.; MASCOLA, L.; WENGER, J. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness on prevention efforts. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 273, p. 1118-1122, 1995.
25. WANG, C.; MURIANA, P. M. Incidence of *Listeria monocytogenes* in packages of retail franks. **J. Food Protect.**, v. 57, p. 382-386, 1994.
26. WENGER, J. D.; SWAMINATHAN, B.; HAYES, P. S.; GREEN, S. S.; PRATT, M.; PINNER, R. W.; SCHUCHAT, A.; BROOME, C. *Listeria monocytogenes* contamination of turkey franks: evaluation of a production facility. **J. Food Protect.**, v. 53, p. 1015-1019, 1990.
27. YEN, L. C.; SOFOS, J. N.; SCHMIDT, G. R. Effect of meat curing ingredients on thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in ground pork. **J. Food Protect.**, v. 54, p. 408-412, 1991.

28. YOUSEF, A. E.; LUCHANSKY, J. B.; DEGNAN, A. J.; DOYLE, M. P. 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or pediocin AcH during storage at 4 or 25°C. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 1461-1467, 1991.
29. ZAIKA, L. L.; PALUMBO, S. A.; SMITH, J. L.; DEL CORRAL, F.; BHADURI, S.; JONES, C. O.; KIM, A. H. Destruction of *Listeria monocytogenes* during frankfurter processing. **J. Food. Protect.**, v. 53, p. 18-21, 1990.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A segurança alimentar de produtos cárneos prontos para consumo vem sendo amplamente discutida, visando o desenvolvimento de estratégias de controle que possam assegurar a inocuidade desses alimentos, uma vez que, somente a embalagem a vácuo e a estocagem sob temperatura de refrigeração, podem não servir como barreiras suficientes para garantir a qualidade microbiológica desses alimentos.

Pesquisas tem demonstrado a capacidade de multiplicação e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos prontos para consumo, produtos estes que podem ser fonte de veiculação de listeriose, por serem alimentos que podem ser consumidos sem reaquecimento.

Os dados epidemiológicos no Brasil referentes a doenças transmitidas por alimentos são escassos, principalmente no que se refere a listeriose. Apesar de a doença apresentar um alto risco de morbidade e mortalidade, principalmente para populações susceptíveis, a legislação vigente ainda está restrita a queijos. A ausência de dados estatísticos sobre a incidência de *L. monocytogenes* em alimentos, assim como a ausência de um sistema eficiente de vigilância epidemiológica dos casos de listeriose ocorridos no país, não só dificultam a implementação de medidas de controle bem como não fornecem as informações necessárias para compreender o papel do alimento contaminado em surtos e o percentual de infecções causados por este.

Uma grande quantidade de produtos cárneos são consumidos anualmente no país. Do volume total de produtos cárneos industrializados consumidos no Brasil, 23,4% se refere ao consumo de salsichas. De acordo com a Associação dos Dogueiros Autônomos Motorizados do Estado de São Paulo (Adamesp), somente na Grande São Paulo, 96 milhões de salsichas são consumidas anualmente, sem considerar aquelas consumidas em estabelecimentos não associados. Conseqüentemente, a presença de *L. monocytogenes* nesse tipo de produto é de grande interesse da saúde pública, devido ser um alimento popular, de baixo custo e acessível a maioria da população,

além de ser um produto geralmente manipulado sob condições críticas de higiene e armazenado inadequadamente.

Logo, diante do potencial de multiplicação de *L. monocytogenes* em salsichas e em produtos cárneos prontos para consumo, faz-se necessário a revisão do regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos com a instituição de padrões microbiológicos para *L. monocytogenes* em carnes e produtos cárneos, estabelecendo critérios de detecção e níveis de tolerância para o patógeno na legislação vigente. Além disso, deve ser estabelecida e divulgadas medidas de controle preventivo e de orientação educacional, alertando os consumidores sobre os fatores responsáveis pela transmissão de listeriose, assegurando assim a melhoria da qualidade e a inocuidade dos alimentos e visando eliminar casos da doença decorrente do consumo de alimentos contaminados.