

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS PRESENTES EM PRESUNTO  
COZIDO FATIADO E A INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS NA  
MANUTENÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E INOCUIDADE DO  
ALIMENTO**

STÉFANO CAON TALLAMINI

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Amanda de Souza da Motta

Porto Alegre, Dezembro de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Tallamini, Stéfano Caon

Avaliação de Bactérias Psicrotróficas presentes em Presunto Cozido Fatiado e a Influência de Fatores Ambientais na Manutenção da Qualidade Microbiológica e Inocuidade do Alimento / Stéfano Caon Tallamini. -- 2016.

137 f.

Orientadora: Amanda de Souza da Motta.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Micro-organismos psicrotróficos. 3. Presunto Cozido. 4. Hibisco. 5. Pediocina. I. da Motta, Amanda de Souza, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS PRESENTES EM PRESUNTO  
COZIDO FATIADO E A INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS NA  
MANUTENÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E INOCUIDADE DO  
ALIMENTO**

Stéfano Caon Tallamini  
Médico Veterinário – UDESC

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia agrícola

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amanda de Souza da Motta

Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil

Dezembro de 2016

Dedico esse trabalho especialmente para à professora e grande amiga Maria Lúcia Scroferneker, por todo apoio fornecido nos momentos mais difíceis, mostrando que não há tempo ruim quando se possui um bom coração, fortalecendo ainda mais a sua imagem de profissional que devemos nos espelhar.

Ainda dedico à minha família, por todo amparo e amor que me foi dado durante esta etapa de minha vida.

# AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS PRESENTES EM PRESUNTO COZIDO FATIADO E A INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS NA MANUTENÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E INOCUIDADE DO ALIMENTO<sup>1</sup>

Autor: Stéfano Caon Tallamini

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Amanda de Souza da Motta

## RESUMO

Este estudo objetivou analisar o potencial de deterioração da microbiota psicotrófica presente em presunto cozido fatiado comercializado entre Maio e Junho de 2015 e Fevereiro e Março de 2016 no mercado público da cidade de Porto Alegre/RS e avaliar a influência de fatores ambientais na qualidade microbiológica do mesmo. Os presuntos foram coletados em 4 bancas desse local e foram realizadas contagens de bactérias psicotróficas de 8 amostras e pesquisa de *Listeria monocytogenes*. Selecionaram-se 134 colônias de psicotróficos isolados de presunto fatiado, 71 deles apresentaram atividade proteolítica, 58 atividade lipolítica e 12 apresentaram produção de exopolissacarídeo. Selecionaram-se 2 bactérias com a presença dessas atividades para identificação molecular, as quais foram identificadas como *Kluyvera* sp. e *Carnobacterium* sp. Além delas, mais 2 *Listeria monocytogenes* isoladas nesse trabalho foram submetidas ao teste de produção de biofilme, resultando como fracas formadoras e também ao teste de aderência em aço inoxidável, todas apresentando capacidade de adesão. A pesquisa de *Listeria monocytogenes* nos presuntos fatiados mostrou 100% de presença, sendo que 50% foram identificadas como *L. monocytogenes*, as quais pertenceram aos sorotipos 1/2a (1), 1/2b (2), 1/2c (2). Realizou-se análise de presunto cozido inteiro, em sua embalagem original, sendo que não foram encontrados micro-organismos. Tratou-se o presunto fatiado com extrato de hibisco a 40% e pediocina a 0,5% e 1,0% e realizou-se contagem de mesófilos, psicotróficos, *Listeria* spp., *S. aureus* e *E.coli*. O extrato de hibisco reduziu a carga desses micro-organismos. Pediocina 0,5% e 1% apresentaram pouca ação frente ao controle de mesófilos, psicotróficos e *E. coli*, mas mantiveram a carga de *S. aureus* controlada e foram eficazes contra *Listeria* spp. Foram realizadas também contagens para *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, mesófilos e psicotróficos em suabes oriundos de fatiador de alimentos, superfície de contato e utensílio utilizados nas bancas do mercado público. Em conclusão grande parte dos psicotróficos apresentou atividade proteolítica e lipolítica, as quais alteram organolepticamente o alimento. Alguns apresentaram produção de biofilme e capacidade de aderência, fato indesejado, pois sua remoção é mais difícil no ambiente industrial, com isso nota-se que a legislação brasileira apresenta carência na contagem de psicotróficos em produtos cárneos.

**Palavras-chave:** *Listeria monocytogenes*, psicotrófico, pediocina, extrato de hibisco

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Dezembro de 2016.

# EVALUATION OF THE PSYCHOTROPHIC BACTERIA PRESENT IN SLICED BAKED HAM AND THE INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS IN MAINTENANCE OF MICROBIOLOGICAL QUALITY AND FOOD SAFETY<sup>1</sup>

Author: Stéfano Caon Tallamini

Advisor: Prof. Dr<sup>a</sup>. Amanda de Souza da Motta

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the microbiota present in sliced cooked ham sold in the public market in Porto Alegre/RS and evaluate the ability of compounds with antimicrobial activity of hibiscus extract and pediocin to control the microbiota found. Ham collected was stored refrigerated until to arrive the laboratory for analysis. Psychrotrophic bacteria counts were performed. Were selected 134 colonies of psychrotrophic microorganisms isolated for sliced ham and 71 of them showed proteolytic activity, 58 lipase activity, 12 showed production of exopolysaccharide. Two of these bacteria were selected for molecular identification which were identified as *Kluyvera* sp. and *Carnobacterium* sp. These two bacteria plus two *Listeria monocytogenes* isolated for sliced ham were subjected to testing of biofilm production (resulting as weak forming of biofilm) and were tested for adhesion in stainless steel and all showed this property. The research of *Listeria* spp. in sliced cooked ham showed 100% of presence, which 50% were identified as *L. monocytogenes* to serotypes 1/2a (1) 1/2b (2), 1/2c (2). Analysis was carried out of a whole piece of cooked ham in its original packaging and none microorganisms were found. The sliced ham was treated with hibiscus extract of 40% and pediocin of 0.5% and 1.0% and has been mesophilic, psychrotrophic, *Listeria* spp., *S. aureus* and *E. coli* counts. The hibiscus extract reduced the quantity of these microorganisms. Pediocin 0.5% and 1,0% had little action against the control of mesophilic, psychrotrophic and *E. coli*, but in *S. aureus* counts were controlled bacteria charge and were effective against *Listeria* spp.. Also counts of *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, mesophilic and psychrotrophic bacteria were performed from swabs of slicer food, contact surface and food tool (knife or spatula) used in public market stalls. In conclusion, most of the psychrotrophs presented proteolytic and lipolytic activity, which alter organoleptically the food. Some of them have presented biofilm production and adhesion capacity, undesirable fact because when the biofilm is formed is more difficult to remove it in the industrial environment. With this it is showed that the brazilian legislation presents a lack in the research of psychrotrophs in meat products kept refrigerated.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, psychrotrophic, pediocin, hibiscus extract

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. December, 2016.

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
2	Objetivos.....	3
2.1	Objetivos Gerais.....	3
2.2	Objetivos Específicos.....	3
3	Revisão Bibliográfica.....	4
3.1	Produtos Cárneos Prontos para o Consumo.....	4
3.1.1	Presunto Cozido Fatiado.....	5
3.2	Qualidade Microbiológica de Produtos Cárneos.....	6
3.2.1	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	8
3.2.2	<i>Salmonella</i> spp.....	11
3.2.3	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva.....	12
3.2.4	<i>Escherichia coli</i> .....	13
3.2.5	Bactérias Psicotróficas.....	14
3.3	Fatores que Afetam o Crescimento Microbiano.....	16
3.4	Enzimas Extracelulares.....	18
3.5	Biofilmes Microbianos.....	19
3.6	Compostos Com Potencial Antimicrobiano.....	21
3.6.1	Hibisco.....	21
3.6.2	Bacteriocinas.....	23
4	Materiais e Métodos.....	25
4.1	Contagem de Bactérias Mesófilas e Psicotróficas em Presunto Cozido Fatiado.....	25
4.2	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> em Presunto Cozido Fatiado... ..	26
4.2.1	Enriquecimento Primário.....	26
4.2.2	Enriquecimento Secundário.....	26
4.2.3	Plaqueamento Diferencial.....	26
4.3.4	Identificação dos Isolados.....	26
4.3	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. em Presunto Cozido Fatiado.....	27
4.3.1	Pré-enriquecimento.....	27
4.3.2	Enriquecimento Seletivo.....	27
4.3.3	Plaqueamento Diferencial.....	27
4.3.4	Identificação dos Isolados.....	28
4.4	Contagem e Pesquisa de Micro-organismos Patogênicos, Bactérias Mesófilas e Psicotróficas em Presunto Cozido Inteiro.....	28
4.5	Seleção e Isolamento de Bactérias Psicotróficas de Presunto Cozido Fatiado.....	29
4.6	Avaliação da Atividade Proteolítica e Lipolítica das Bactérias Psicotróficas.....	29
4.7	Avaliação da Produção de Exopolissacarídeos pelas Bactérias Psicotróficas.....	30
4.8	Identificação Preliminar das Bactérias Psicotróficas Seleccionadas e Avaliação do Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos.....	30
4.9	Avaliação da Formação de Biofilmes pelas Bactérias Psicotróficas.....	31
4.10	Avaliação da Adesão em Aço Inoxidável pelos Isolados Psicotróficos.....	32
4.11	Avaliação do Comportamento de Bactérias Psicotróficas, Mesófilas e Patogênicas em Presunto Cozido Fatiado, Tratados com	

	Pediocina e Extrato de Hibisco.....	33
4.11.1	Avaliação da Capacidade Inibitória de Pediocina e Hibisco.....	33
4.11.2	Avaliação da Vida de Prateleira e Microbiota Mesófila, Psicotrófica e Patogênica Presente em Presunto Cozido Fatiado Submetido a Tratamentos de Pediocina e Hibisco.....	34
4.12	Contagem e Pesquisa de Micro-organismos Patogênicos, Bactérias Mesófilas e Psicotróficas Obtidas de suabes de Superfície.....	36
5	Resultados e Discussão.....	39
5.1	Contagem de Bactérias Mesófilas e Psicotróficas em Presunto Cozido Fatiado.....	39
5.2	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> em Presunto Cozido Fatiado...	40
5.3	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. em Presunto Cozido Fatiado.....	42
5.4	Contagem e Pesquisa de Micro-organismos Patogênicos, Mesófilos e Psicotróficos em Presunto Cozido Inteiro.....	43
5.5	Seleção e Capacidade Enzimática de Bactérias Psicotróficas Isoladas de Presunto Cozido Fatiado.....	43
5.6	Avaliação da Produção de Exopolissacarídeos pelas Bactérias Psicotróficas Isoladas de Presunto Fatiado.....	46
5.7	Identificação das Bactérias Psicotróficas Seleccionadas e Avaliação do Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos.....	48
5.7.1	Identificação Molecular.....	48
5.7.2	Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos.....	49
5.8	Formação de Biofilme pelas Bactérias Psicotróficas seleccionadas..	53
5.9	Avaliação da Adesão em Corpos de Aço Inoxidável pelos Isolados Psicotróficos Seleccionados.....	55
5.10	Avaliação do Comportamento de Bactérias Psicotróficas, Mesófilas e Patogênicas em Presunto Cozido Fatiado, Tratado com Pediocina e Extrato de Hibisco.....	57
5.10.1	Avaliação da Concentração Inibitória de Pediocina e Hibisco.....	57
5.10.2	Resultados do Comportamento de Micro-organismos Psicotróficos, Mesófilos e Patogênicos em Presunto Cozido Fatiado frente ao Tratamento com Pediocina e Extrato de Hibisco.....	59
5.10.2.1	Presunto Cozido Fatiado Submerso Continuamente ao Tratamento com Pediocina e Extrato de Hibisco.....	59
5.10.2.1.1	Contagem de Mesófilos.....	60
5.10.2.1.2	Contagem de Psicotróficos.....	61
5.10.2.1.3	Contagem de <i>Listeria</i> spp.....	62
5.10.2.1.4	Contagem de <i>E. coli</i> .....	63
5.10.2.1.5	Contagem de <i>S. aureus</i> .....	64
5.10.2.2	Presunto submerso por 1 hora e 40 minutos no Tratamento com Pediocina e Extrato de Hibisco.....	64
5.10.2.2.1	Contagem de Mesófilos.....	64
5.10.2.2.2	Contagem de Psicotróficos.....	65
5.10.2.2.3	Contagem de <i>Listeria</i> spp.....	66
5.10.2.2.4	Contagem de <i>E. coli</i> .....	67
5.10.2.2.5	Contagem de <i>S. aureus</i> .....	69
5.10.3	Discussão do Comportamento de Micro-organismos Psicotróficos, Mesófilos e Patogênicos em Presunto Cozido Fatiado frente ao Tratamento com Pediocina e Extrato de Hibisco.....	70
5.11	Contagem e Pesquisa de Micro-organismos Patogênicos, Bactérias	



	Mesófilas e Psicotróficas obtidas de suabes de Superfície.....	73
5.11.1	Contagem de micro-organismos mesófilos e psicotróficos em suabes coletados no mercado público.....	74
5.11.2	Contagem de <i>Listeria</i> spp. em suabes coletados no mercado público.....	75
5.11.3	Contagem de <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva em suabes coletados no mercado público.....	76
5.11.4	Contagem de coliformes totais e fecais em suabes e presunto fatiado coletados no mercado público.....	78
6	Conclusões.....	80
7	Referências.....	82
8	Anexos.....	104

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Micro-organismos exigidos pela legislação em análises microbiológicas de alguns produtos cárneos e seus limites quantitativos toleráveis.....	07
Tabela 2	Parâmetros intrínsecos e extrínsecos que afetam a multiplicação microbiana.....	17
Tabela 3	Limites de multiplicação microbiana; atividade de água, pH e temperatura.....	18
Tabela 4	Contagem bacteriana de micro-organismos mesófilos e psicotróficos encontrados em presunto cozido fatiado.....	39
Tabela 5	Espécies e sorotipos de <i>Listeria</i> presentes em presunto cozido fatiado.....	40
Tabela 6	Média dos halos de proteólise das bactérias psicotróficas avaliadas em meio de cultura ágar leite.....	44
Tabela 7	Média dos halos lipolíticos dos isolados psicotróficos em ágar tributirina.....	45
Tabela 8	Isolados de bactérias psicotróficas produtoras de exopolissacarídeo em ágar vermelho congo.....	47
Tabela 9	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos micro-organismos psicotróficos isolados de presunto cozido fatiado.....	50
Tabela 10	Média da densidade óptica da produção de biofilme pelos isolados selecionados com e sem adição de 1% de glicose.....	53
Tabela 11	Valores das contagens de bactérias planctônicas e de bactérias aderidas em aço inoxidável.....	55
Tabela 12	Médias dos halos translúcidos circundantes às gotas de pediocina 0,5% e 1,0% em ágar Mueller Hinton.....	58
Tabela 13	Médias dos halos translúcidos circundantes às gotas de extrato de hibisco em diferentes concentrações em ágar Mueller Hinton...	58
Tabela 14	Contagem de micro-organismos mesófilos durante o tratamento contínuo com pediocina e extrato de hibisco do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles.....	60
Tabela 15	Contagem de micro-organismos psicotróficos durante o tratamento contínuo com pediocina e extrato de hibisco, do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles.....	61
Tabela 16	Contagem de <i>Listeria</i> spp. durante o tratamento contínuo com pediocina e extrato de hibisco, do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles.....	62
Tabela 17	Contagem de <i>E. coli</i> durante o tratamento contínuo com pediocina e extrato de hibisco, do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles.....	63
Tabela 18	Contagem de mesófilos durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco, do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles.....	64
Tabela 19	Contagem de psicotróficos durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco, do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles.....	66
Tabela 20	Contagem de <i>Listeria</i> spp. durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco, do presunto cozido fatiado e	

	similaridade estatística entre eles.....	67
Tabela 21	Contagem de <i>E. coli</i> durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco, do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles.....	68
Tabela 22	Contagem de <i>S. aureus</i> durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco, do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles.....	69
Tabela 23	Contagem de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos presentes em suabes do ambiente do mercado público.....	74
Tabela 24	Contagem de <i>Listeria</i> spp. presente em suabes do ambiente do mercado público.....	75
Tabela 25	Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva presentes em suabes do ambiente do mercado público.....	77
Tabela 26	Contagem de coliformes totais e fecais presentes em presunto fatiado e no ambiente do mercado público.....	78

## Lista de Figuras

Figura 1	Análise de presunto inteiro.....	29
Figura 2	Divisão dos grupos de presunto antes de receberem os tratamentos com pediocina e extrato de hibisco.....	35
Figura 3	Tratamento do presunto com pediocina 1,0% e com extrato de hibisco 40%, respectivamente.....	35
Figura 4	Reação positiva de <i>Salmonella</i> sp. ATCC 8327 com o anti-soro polivalente anti- <i>Salmonella</i> .....	42
Figura 5	Colônias produtoras de ESP (colônias pretas e rugosas) em meio CRA.....	47
Figura 6	Contagem de colônias planctônicas em meio PCA.....	55
Figura 7	Mensuração dos halos translúcidos por adição de pediocina.....	57

## Lista de Gráficos

Gráfico 1	Contagem de micro-organismos mesófilos durante o tratamento contínuo com pediocina e extrato de hibisco do presunto cozido fatiado.....	60
Gráfico 2	Contagem de micro-organismos psicotróficos durante o tratamento contínuo com pediocina e extrato de hibisco, do presunto cozido fatiado.....	61
Gráfico 3	Contagem de <i>Listeria</i> spp. durante o tratamento contínuo com pediocina e extrato de hibisco, do presunto cozido fatiado.....	62
Gráfico 4	Contagem de <i>E. coli</i> durante o tratamento contínuo com pediocina e extrato de hibisco, do presunto cozido fatiado.....	63
Gráfico 5	Contagem de mesófilos durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco, do presunto cozido fatiado.....	65
Gráfico 6	Contagem de micro-organismos psicotróficos durante o tratamento contínuo com pediocina e extrato de hibisco do presunto cozido fatiado.....	65
Gráfico 7	Contagem de <i>Listeria</i> spp. durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco, do presunto cozido fatiado.....	67
Gráfico 8	Contagem de <i>E. coli</i> durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco, do presunto cozido fatiado.....	68
Gráfico 9	Contagem de <i>S. aureus</i> durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco, do presunto cozido fatiado.....	69

## Lista de Abreviaturas e Siglas

%	Porcentual
°C	Graus Celsius
ALOA	Ágar <i>Listeria</i> de Otaviani e Agosti
cm <sup>2</sup>	Centímetros Quadrados
CRA	Ágar vermelho congo
EMB	<i>Eosin-Methylene Blue</i>
LIA	<i>Lysine Iron Agar</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>
UFC	Unidades formadoras de colônia
XLD	<i>Xylose-Lysine-Deoxycholate</i>

## 1. INTRODUÇÃO

Os processos que um alimento passa durante seu preparo na indústria visam sempre que o mesmo seja considerado seguro para consumo humano, ou seja, que ele não possa vir a causar danos à saúde do consumidor. Esse fato é garantido desde a chegada da matéria na indústria até o produto final chegar às mãos dos consumidores.

Os embutidos fatiados comercializados a granel são produtos cárneos industrializados, dentre eles destaca-se o presunto cozido, o qual tem como identidade - segundo a Instrução Normativa número 20, de 31 de Julho de 2000 - ser um produto obtido exclusivamente com o pernil de suínos, desossado, adicionado de ingredientes, e submetido a um processo de cozimento adequado (esterilidade comercial), sendo que esse processo reduz significativamente o número de micro-organismos patogênicos que podem estar sendo veiculados por esses alimentos.

Os setores de fiambreteria dos supermercados seccionam e redistribuem as peças inteiras desses produtos oriundos da indústria, sendo essa etapa um ponto crítico de controle para evitar-se a contaminação cruzada, ou seja, a contaminação de um alimento que se apresentava comercialmente estéril.

Tal fato pode ocorrer por más condições de manuseio dos funcionários ou de limpeza inadequada de equipamentos. Isso pode se dar por que não há um serviço de inspeção como ocorre nas indústrias, com uma fiscalização rigorosa dos funcionários depois do treinamento. Conseqüentemente como o produto não sofre mais nenhum processo térmico ao ser fatiado, é onde podem ocorrer não só surtos epidemiológicos de enfermidades como também a diminuição da vida de prateleira do produto.

A vida de prateleira de um produto é o período de tempo entre o estabelecimento do produto final e seu consumo, período este em que devem ser mantidas em níveis satisfatórios as propriedades nutricionais, organolépticas e microbiológicas. Para estimativa desse tempo, leva-se em conta o comportamento microbiano em relação às propriedades do alimento analisado e suas condições de estocagem, como temperatura. É de indiscutível importância a qualidade microbiana desse alimento, pois os micro-organismos ao se multiplicarem utilizam os nutrientes,

proteínas e outros componentes presentes e acabam destruindo as propriedades do alimento e inviabilizando-o para o consumo humano.

Além das variáveis de temperatura de armazenamento e propriedades nutricionais, o presunto cozido apresenta uma boa capacidade de retenção água, componente importante para crescimento bacteriano, pois torna o ambiente umidificado.

O presunto deve ser devidamente mantido em temperatura de refrigeração; tal fato gera oportunidade de crescimento para as bactérias psicrófilas, dando-lhes as condições ideais necessárias para desenvolvimento. A contaminação por esses micro-organismos é relativamente comum, fato indesejado, visto que reduz a vida de prateleira do produto por deteriorá-lo precocemente. Todavia, não há decreto na legislação brasileira que obrigue a pesquisa de micro-organismos psicrófilos em produtos cárneos, sugerindo assim que há uma deficiência no sistema de inspeção microbiológica, visto a grande quantidade presente nesse tipo de alimento.

Algumas alternativas podem ser ministradas a fim de retardar a degradação do presunto cozido, como por exemplo, o emprego de bacteriocinas e extratos naturais, os quais buscam o impedimento ou a redução do crescimento bacteriano e conseqüentemente a diminuição da atividade bacteriana e a produção de enzimas de degradação. Outro ponto alternativo seria uma higiene mais rígida e frequente dos equipamentos de fatiamento.

Esse trabalho visou uma avaliação de micro-organismos psicrófilos presentes em presunto cozido fatiado quanto à capacidade deteriorante, à produção de biofilme e à capacidade de adesão em aço inoxidável, fato preocupante dentro da indústria de alimentos. Também visou avaliar métodos alternativos para o controle do crescimento microbiano através do uso de compostos naturais como pediocina e extrato de hibisco. Por fim foi realizado um monitoramento nos pontos de venda dos presuntos, buscando-se as possíveis origens da contaminação deste alimento.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo a análise microbiológica de micro-organismos psicrotróficos em amostras de presunto cozido e fatiado, obtidas nas Bancas pertencentes ao Mercado Público de Porto Alegre, RS.

### 2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliação da qualidade microbiológica dos presuntos cozidos fatiados, com a quantificação de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos.

2.2.2 Avaliação da presença de bactérias patogênicas nas amostras de presunto cozido fatiado.

2.2.3 Identificação de bactérias psicrotróficas e avaliação da capacidade de produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas.

2.2.4 Avaliação da capacidade de adesão e produção de biofilmes pelas bactérias psicrotróficas

2.2.5 Avaliação do desenvolvimento de bactérias psicrotróficas em amostras de presunto cozido fatiado, tratados com pediocina e extrato de hibisco

2.2.6 Identificação dos possíveis pontos de contaminação do presunto cozido fatiado no ambiente de fiambreira das bancas do mercado público de Porto Alegre.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 PRODUTOS CÁRNEOS PRONTOS PARA O CONSUMO

Uma das principais tendências alimentares são os produtos prontos para o consumo, uma vez que se observa um aumento na demanda desse tipo de alimento (GERMANO e GERMANO, 2008; FORSYTHE, 2013). Sabe-se que estes são alimentos que não se mantêm as propriedades originais da carne *in natura*, ou seja, há uma alteração dessas propriedades por tratamentos físico, químico ou biológico, ou ainda pela combinação destes tratamentos (PARDI et al., 2001).

No processamento da carne, normalmente fazem-se cominuições ou cortes da mesma, com adição de condimentos, especiarias e de aditivos. Esse processo de industrialização da carne acaba prolongando a vida de prateleira do produto, pois minimiza ou anula a ação de micro-organismos através de suas enzimas, o que mantém as propriedades nutritivas e organolépticas por maior período (PARDI et al., 2001).

Apesar de existirem diversos fatores que influenciam a qualidade sensorial e a segurança de, por exemplo, um produto cárneo fatiado, após revisão de literatura, não foram encontrados trabalhos científicos nem legislações que especifiquem a validade comercial de produto cárneo após o fatiamento. Isso é preocupante visto que cada estabelecimento é que determina, sem critérios científicos, a validade comercial dos produtos fatiados (SOUZA, 2015).

Os produtos vendidos como peça inteira em supermercados em geral apresentam os maiores prazos de validade, seguidos pelos presuntos fatiados embalados pelas indústrias. Os primeiros provavelmente em geral possuem maior validade cerca de 2 meses por não serem submetidos ao processo de fatiamento, que os expõe a um maior risco de contaminação. Os frios fatiados e embalados pela indústria apresentam diferenças de período de validade entre as marcas reconhecidas no mercado. Essa diferença pode decorrer do processo produtivo, do tipo de embalagem e do acondicionamento dos produtos (SOUZA, 2015). Uma grande proporção desse produto é fatiada pelo estabelecimento de varejo e embalada sem qualquer prazo de validade nos pacotes, sendo assim o tempo de armazenamento desse alimento depende unicamente do consumidor, que muitas

vezes não tem noção da temperatura em que se mantém seu refrigerador doméstico (MARKLINDER et al, 2004; GARAYOA et al., 2005). Segundo Carrasco et al. (2007) e Godwin et al. (2007) observa-se que grande porcentagem dos refrigeradores domésticos e de varejo está acima de 4°C, sendo essa a temperatura recomendada para manterem-se os alimentos prontos para o consumo, facilitando o crescimento de patógenos psicotróficos que por ventura estejam presentes no alimento.

### 3.1.1 PRESUNTO COZIDO FATIADO

Observa-se uma crescente preocupação frente à importância da veiculação de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. em produtos cárneos derivados de suínos, com ênfase aos produtos prontos para o consumo, que não necessitam de tratamento térmico, como é o caso do presunto cozido (SALVATORI, BESSA e CARDOSO, 2003; JO et al, 2005; MOTTIN et al, 2006; MEHRABIAN e JABERI, 2007). Esse alimento é um dos produtos mais populares no mundo (TOLDRÁ, 2004)

De acordo com a definição dada pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Presunto na Instrução Normativa número 20, de 31 de julho de 2000, entende-se por presunto cozido o produto cárneo industrializado obtido exclusivamente com o pernil de suínos, desossado, adicionado de ingredientes, curado em salmoura, submetido a um processo de cozimento adequado e refrigerado após a cocção (BRASIL, 2000; ORDOÑEZ et al, 2005).

Segundo Roça (2000), as etapas que envolvem o processo de produção do presunto cozido são:

- Pesagem do pernil de suíno sem o couro e desossado;
- Injeção de solução de cura, numa proporção de 25% do peso do pernil;
- Cura e tambeamento: feita sob refrigeração (2 a 4°C) durante 4 a 6 dias;
- Enformagem: formas de aço inox, protegendo com um filme plástico;
- Cozimento: cozinhar em banho-maria a 85°C. As formas de 500 g devem ser cozidas por 55 minutos e as formas de 1000 g por 90 minutos;
- Esfriar as formas em água corrente e depois em refrigeração por 24 horas;
- Desenformar e embalar à vácuo e armazenar sob refrigeração.

Tem por características a apresentação de no mínimo 14% de proteína bruta, pH entre 5,9 e 6,1 e atividade de água variando entre 0,91 a 0,97, sendo que tais

características tornam o produto susceptível a contaminação por patógenos (JAY, 2005; BRASIL, 2000). A contaminação do produto pode ser durante a cura, durante ou depois da desossa, corte e embalagem (TOMPKIN, 2002).

### 3.2 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS CÁRNEOS

A tendência do aumento da procura de alimentos prontos para o consumo gera uma maior atenção quanto à inocuidade dos alimentos, visto que os mesmos não necessitam de aquecimento prévio antes do consumo e conseqüentemente aumentam o risco de possíveis micro-organismos causadores de doenças sendo veiculados via produto (GERMANO e GERMANO, 2008).

Devido ao excelente teor nutricional contido nos alimentos, eles tornam-se de grande importância diária para os consumidores, contudo toda essa abundância nutricional, por exemplo, faz das carnes, em geral, um meio ideal para crescimento microbiano (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Em termos de segurança microbiológica e alimentar existe uma ampla variedade de micro-organismos patogênicos que frequentemente contaminam os alimentos, podendo apresentar risco à saúde do consumidor. Podem causar intoxicações (através da ingestão de seus metabólitos), infecções (por ingestão de células bacterianas viáveis) ou ainda toxi-infecções pela ingestão de células viáveis produtoras de toxinas (GAVA, SILVA e FRIAS, 2008).

A resolução – RDC número 12, de 02 de janeiro de 2001, traz os limites máximos toleráveis de determinados micro-organismos que podem ou não estarem presentes nos alimentos e que devem ser pesquisados, como ilustra a tabela 1. A instrução normativa nº 09, de 08 de abril de 2009, institui os procedimentos de controle de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo, sendo que exigem a ausência do patógeno em 25 g do alimento analisado.

A legislação brasileira não estipula um valor limite para os micro-organismos psicrotróficos; contudo segundo Champagne (1994), contagens de psicrotróficos acima de 6 log<sub>10</sub> UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias/ mL) tornam perceptíveis as alterações organolépticas de leite e derivados. Sendo assim, a presença de psicrotróficos é indesejada, visto que possuem capacidade de produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes, as quais mantêm

viáveis suas atividades degradantes mesmo após tratamento térmico. Com isso, alguns problemas relacionados à qualidade dos produtos lácteos como perda das propriedades organolépticas e de consistência e ainda gelatinização ao longo da vida de prateleira do leite UHT (*Ultra High Temperature*), podem estar associados à ação dessas enzimas (ROSSI JÚNIOR et al., 2006).

**Tabela 1.** Micro-organismos exigidos pela legislação em análises microbiológicas de alguns produtos cárneos e seus limites quantitativos toleráveis. Dados expressos em UFC/ml (Unidades Formadoras de Colônias/ mL).

Alimento	Micro-organismo	Tolerância indicativa/ Limite máximo permitido	Número de amostras	Número máximo de lotes com contagem limítrofe
Produtos cárneos cozidos ou não, embutidos ou não (mortadela, salsicha, presunto, fiambre, morcela e outros).	Coliformes a 45°C/g	10 <sup>3</sup>	5	2
	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva/g	3x10 <sup>3</sup>	5	1
	<i>Salmonella</i> sp./25g	Ausência	5	0
	<i>Clostridium</i> sulfito redutor a 46°C	5x10 <sup>2</sup>	5	1

Fonte: ANVISA, RDC 12, de 02 Janeiro de 2001.

As bactérias ácido-láticas estão sendo o maior grupo associado à deterioração de produtos cárneos cozidos embalados à vácuo estocados em temperaturas de refrigeração. Essas bactérias produzem defeitos como odores, esverdeamento e a formação de limo superficial, afetando a vida de prateleira do produto (EGAN, 1983; BORCH, KANT-MUERMANS e BLIXT, 1996; CARVALHO, 2010; SÄDE, 2011).

O crescimento de micro-organismos patogênicos que podem ser veiculados por alimentos, como *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*, não é necessariamente acompanhado por alterações na aparência, odor, sabor ou textura do alimento que possam ser detectados pelos sentidos humanos, logo, podem representar um grave problema de saúde. Já o crescimento de micro-organismos

deteriorantes pode ser rapidamente identificado por alterações sensoriais, muitas vezes provenientes da ação de enzimas produzidas pelos mesmos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

Um correto tratamento térmico, refrigeração adequada, manipulação cuidadosa após o tratamento térmico e a qualidade de barreira ao oxigênio da embalagem à vácuo afetam significativamente a vida de prateleira do produto. O processo térmico dos produtos destrói a maioria dos micro-organismos presentes na matéria-prima, contudo, alguns *Streptococcus* sp. e esporos de *Clostridium* podem sobreviver e acabarem originando problemas de deterioração. Outro organismo termorresistente, *Weissella viridescens*, pode vir a sobreviver e juntamente com *Aerococcus viridans* e *Carnobacterium viridans*, os quais são contaminantes do meio, produzem peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante o período de armazenamento em temperatura de refrigeração e por consequência fazem a descoloração verde na abertura da embalagem à vácuo (HOLLEY e GILL, 2005).

*Enterobacteriaceae* psicrotólicas como a *Serratia*, *Hafnia* e *Enterobacter* podem causar problemas de cor e odor em produtos cárneos curados, caso a temperatura seja superior a 7°C, todavia no que se observam, estes micro-organismos são mantidos sob controle pela combinação mútua de baixa temperatura e atividade de água (0,96- 0,98) (HOLLEY e GILL, 2005).

### 3.2.1 *Listeria monocytogenes*

Dentre os micro-organismos comumente associados com doenças veiculadas por alimentos está *Listeria monocytogenes* e sabe-se que desde 1929 ela vem causando a listeriose em humanos, todavia somente nos anos 80 que sua transmissão foi associada via alimentos (UBOLDI-EIROA, 1990; GERMANO e GERMANO, 2008). Esse micro-organismo pode ter um período de incubação longo – de até 90 dias – fato que dificulta a correlação entre a bactéria e o alimento consumido que a veiculou (GANDHI e CHIKINDAS, 2007; FORSYTHE, 2013).

O gênero *Listeria* é composto por 6 espécies (*L. monocytogenes*; *L. innocua*; *L. seeligeri*; *L. welshimeri*; *L. ivanovii* e *L. grayi*) e dentro dele a *Listeria monocytogenes* é a mais preocupante em termos de saúde pública, pois é a mais patogênica e pode causar uma doença veiculada por alimentos (JAY, 2005; GERMANO e GERMANO, 2008; ANDRADE et al., 2014).

Existem doze sorotipos de *Listeria monocytogenes*, contudo segundo Kathariou (2002), em média, 95% dos isolados de listeriose em humanos são causados pelos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b.

É um bacilo pleomórfico, gram-positivo, com temperatura ideal de crescimento a 37°C, porém por ser uma bactéria psicrótrófica é capaz de se desenvolver em temperaturas baixas (BRANCO et al., 2003; DYKES, 2003; ROCOURT et al, 2003; RHOADES, DUFFY e KOUTSOUMANIS, 2009; CARVALHO, 2010). Essa capacidade faz com que *L. monocytogenes* seja um patógeno importante, principalmente em alimentos que ficam mantidos sob refrigeração, destacando-se os alimentos prontos para o consumo que dispensam qualquer tipo de tratamento térmico ou reaquecimento antes do consumo (KATHARIOU, 2002).

A ampla faixa de crescimento em temperatura que varia de 0,4 até 45°C (BARBOSA et al, 1994; FRANCO e LANDGRAF, 2008), em pH que oscila de 5,0 – 9,0 (BELL E KYRIAKIDES, 2005; FRANCO e LANDGRAF, 2008), capacidade de tolerar estresse osmótico (RHOADES, DUFFY e KOUTSOUMANIS, 2009) e de tolerar altas concentrações de cloreto de sódio (FARBER E PETERKIN, 1991; ROCOURT et al, 2003) facilita à *L. monocytogenes* em multiplicar-se em alimentos que são mantidos sob temperatura de refrigeração (FRANCO e LANDGRAF, 2008). *L. monocytogenes* pode ser facilmente destruída por tratamentos térmicos (TOMPkin, 2002), mas segundo Barbalho et al (2005) e Gonçalves et al (2005) esse patógeno é capaz de sobreviver ao processamento, aumentando as chances de contaminação cruzada com outros alimentos, ainda mais se não houver um bom controle do processamento.

Visto as principais apresentações clínicas da listeriose, sugere-se que a bactéria apresente um tropismo para o sistema nervoso central e para a placenta, podendo causar encefalite, meningite, infecção transplacentária e neonatal, aborto, septicemia, endocardite, infecções localizadas e gastroenterite. Os sinais clínicos em humanos podem ser precedidos por sintomas semelhantes à gripe e podem progredir para sintomas severos e levando até ao óbito (SILVA et al., 2010).

Gestantes, recém-nascidos, idosos, pacientes submetidos à hemodiálise, terapias prolongadas com corticosteróides e imunodeprimidos são a população mais suscetível (BRANCO et al., 2003). A gravidade da infecção nessas populações faz com que seja necessário ter um controle mais rígido para evitar exposição ao agente

(TOMPKIN, 2002). As taxas de mortalidade podem ser elevadas: 70% nos casos de meningite, de 50% de sepse e podem ser maiores que 80% em infecções neonatais (GERMANO e GERMANO, 2008; FORSYTHE, 2013)

De acordo com a literatura não existem muitos relatos de incidência de listeriose no Brasil, segundo Germano e Germano (2008) esse fato pode ser oriundo de subnotificações de doenças veiculadas por alimentos e/ou da dificuldade de diagnóstico.

*Listeria monocytogenes* tem sido isolada não só de leite cru e pasteurizado, queijos, carne bovina e suína, de aves, peixes, embutidos, carne moída de diferentes animais, produtos cárneos crus e termoprocessados, mas também de produtos de origem vegetal, de origem marinha e refeições preparadas (FRANCO e LANDGRAF, 2008; VALLIM et al, 2015).

Diferentes tipos de alimentos são identificados em casos de surtos de listeriose, valendo ressaltar que certos alimentos são considerados de maior importância para a veiculação de *L. monocytogenes*, como é o caso de alimentos prontos para o consumo e refrigerados visto que não é necessário aquecê-los previamente ao consumo, como ainda, possuem uma ampla vida de prateleira, podendo manter viável essa bactéria (SAKATE et al, 2003; LUNDÉN et al 2003; ZHU et al, 2005). Historicamente esse patógeno vem sendo associado como o mais comum encontrado em alimentos prontos para o consumo, principalmente devido a sua natureza ubíqua e por ser capaz de resistir à erradicação feita no local de processamento de alimentos (CARPENTIER E CERF, 2011).

A dose mínima de micro-organismo capaz de causar a infecção ainda não está estabelecida, sendo variável de acordo com o isolado, estado do hospedeiro e fatores de susceptibilidade. Segundo Tompkin (2002), alimentos relacionados em surtos ou casos de listeriose excederam 1.000 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama ou mililitro. Forsythe (2013) sugere que uma dose inferior a 1.000 UFC podem causar a doença, enquanto Jemmi e Stephan (2006) mencionam que a dose infecciosa mínima está entre  $10^2$  e  $10^9$  UFC por grama. Segundo Sakate et al (2003) e Selby et al (2006) alimentos contendo mais de 100 UFC/g ou 100 UFC/mL de *L. monocytogenes* são considerados alimentos de alto risco para transmissão da doença.



### 3.2.2 *Salmonella* sp.

As salmonelas são bacilos gram-negativos, não formadores de esporos, a grande maioria possui motilidade apresentando flagelos peritríqueos e são anaeróbios facultativos, São indol e oxidase negativa e produtoras de ácido sulfídrico, crescem numa faixa que varia entre 7 – 45°C, com temperatura ótima de 37°C e suportam variação de pH entre 4,0 – 9,0 (OLIVEIRA, 2000). Segundo Forsythe (2013) essa faixa de crescimento é mais restrita, ficando entre 5°C até 38°C e são eliminadas a 60°C quando submetidas por 15 a 20 minutos.

Essas bactérias estão amplamente distribuídas no ambiente, sendo o principal *habitat* o trato intestinal de humanos e animais de sangue quente, principalmente aves. As principais fontes de contaminação são a água, o solo, as fezes de animais, os insetos e as superfícies de equipamentos e utensílios de fábricas e cozinhas (SILVA et al., 2010). Todavia, a contaminação inicial é dada através das fezes (QUINN et al., 2005).

*Salmonella* sp. é um dos micro-organismos mais comumente envolvidos em casos de doenças alimentares. A sua presença no alimento ocorre por manipulação inadequada ou contaminação cruzada. A presença de *Salmonella* sp. no alimento, torna-o impróprio para o consumo humano, pelo risco de dano à saúde do consumidor (SILVA et al., 2010).

Os sinais clínicos das salmoneloses surgem após um intervalo de 16 a 72 horas após a ingestão e incluem náusea, vômito, diarreia, febre e cólicas abdominais, calafrios, dor de cabeça e fraqueza (SILVA et al, 2010; FORSITHE 2013). Normalmente a doença é autolimitante, podendo apresentar uma forma mais grave em idosos e crianças (SAMUEL et al, 2007) e tende a persistir durante 2 a 7 dias (FORSITHE, 2013). Humanos e animais podem se infectar sem apresentar sintomas, assim tornam-se portadores assintomáticos, os quais esporadicamente podem excretar salmonelas contaminando o ambiente e animais (FRANCO e LANDGRAF, 2008). A salmonelose é uma das principais zoonoses mundiais, o aparecimento de novos sorovares está relacionado ao uso indiscriminado de antibióticos (VELGE, CLOECKAERT e BARROW, 2005)

### 3.2.3 *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA

O gênero *Staphylococcus* possui mais de 30 espécies, são cocos gram-positivos, anaeróbios facultativos, catalase positiva, imóveis, oxidase negativo e não formadores de esporos (QUINN et al., 2005). São bactérias mesófilas, podem crescer em temperatura de 6,7°C até 47,8°C, podendo produzir suas toxinas na faixa de 10°C até 46°C (JAY, 2005). Suportam variação de pH entre 4,0 – 9,8. São tolerantes a concentrações de 10 – 20% de cloreto de sódio e a nitratos, o que torna os alimentos curados, veículos potenciais para o seu crescimento (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

São comensais da pele de animais e de humanos. Também são encontrados em mucosas do trato respiratório superior e urogenital inferior e como transitórios no trato digestivo, sendo relativamente estáveis no meio ambiente (QUINN et al., 2005). As fontes de contaminação mais importantes em termos de alimentos estão relacionadas com as narinas, mãos e braços de manipuladores de alimentos (THAYER e BOYD, 1992; JAY, 2005).

O *Staphylococcus aureus* é a espécie de maior importância dentro do gênero, uma vez que pode ser veiculado por alimentos. É frequente em nosso meio, principalmente nas épocas mais quentes do ano uma vez que essa época facilita sua multiplicação e dificulta a manutenção da cadeia do frio dos alimentos. Não é capaz de crescer em temperatura de refrigeração, necessita que haja uma temperatura abusiva à essa para se multiplicar (ERDMAN, THATCHER e MCQUEEN, 1961; THAYER e BOYD, 1992; VALSECHI, 2006; CARVALHO, 2010). *S. aureus* causa uma intoxicação, provocada pela ingestão de toxinas pré-formadas no alimento, quando ocorre a multiplicação das células. As toxinas são proteínas de baixo peso molecular, resistentes à cocção e as enzimas proteolíticas. A ingestão de menos de 1 µg já pode gerar a sintomatologia da intoxicação, sendo essa quantidade atingida quando a população de *S. aureus* obtém valores entre  $10^5$  –  $10^6$  UFC/g de alimento (SILVA et al., 2010). O aparecimento dos sintomas normalmente aparece 4 horas após a ingestão do alimento contaminado e incluem náuseas, cólicas abdominais agudas, diarreia, dor de cabeça, sudorese, prostração e queda da temperatura corporal. Os sintomas duram em média de 24 a 48 horas (JAY, 2005).

A legislação estabelece um limite de  $10^3$  UFC/g de alimento para esse patógeno em produtos de origem animal e um valor acima torna o alimento impróprio para o consumo humano, por estar fora dos padrões sanitários (SILVA et al., 2010).

#### 3.2.4 *Escherichia coli*

Na tentativa de isolar o agente etiológico da cólera, o médico austríaco Escherich, em 1885 acabou isolando um micro-organismo conhecido atualmente como *Escherichia coli*. Então, com o passar do tempo sugeriu-se o uso dessa bactéria como indicador de poluição fecal e somente em 1985 um teste foi sugerido para mensurar a potabilidade da água, sendo um marco do início do uso dos coliformes como indicadores de patógenos em água, prática que também foi estendida aos alimentos (JAY 2005).

A indústria alimentícia padronizou a quantificação desse micro-organismo como indicador da qualidade higiênico-sanitária, ou seja, a presença de coliformes nos alimentos indica condições inadequadas de higiene durante ou após a fabricação do produto e sugere a presença de enteropatógenos, uma vez que é um indicador de contaminação fecal (FRANCO e LANDGRAF, 2008; CARVALHO, 2010)

Os coliformes podem ser encontrados colonizando o trato intestinal do homem e de animais de sangue quente sem causar doenças, porém algumas linhagens e sorotipos podem provocar injúrias severas, sendo altamente patogênicas ao ser humano (GERMANO e GERMANO, 2008). Muitas linhagens de *E. coli* são de baixa virulência, todavia podem causar infecções oportunistas extra-intestinais; em contrapartida as linhagens patogênicas podem provocar sérias manifestações clínicas, podendo levar ao óbito (QUINN et al., 2005). Podem causar diarreia, infecção urinária, doenças respiratórias e outras enfermidades, variando o período de incubação da doença dependendo da linhagem e sorotipo de infecção - enteropatogênica, enterotoxigênica, enterohemorrágica, enteroinvasiva (VALSECHI, 2006; GERMANO e GERMANO, 2008) ou enteroagregativa (ANDRADE, HAAPALAINEN e NETO, 2011).

A *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo, produtor de indol e incapaz de utilizar citrato como a única fonte de carbono, está incluída nos grupos dos coliformes termotolerantes (SILVA et al., 2010). São bactérias mesófilas, com capacidade de multiplicação entre 7°C a 46°C, com temperatura ótima de

crescimento a 37°C, no entanto ainda existem cepas que são capazes de se multiplicarem a 4°C. Pode ser destruída a 60°C e é capaz de sobreviver por longo período em temperatura de refrigeração. Sua contaminação nos solos e águas está relacionada ao fato de serem eliminadas pelas fezes, uma vez que representam cerca de 80% da microbiota intestinal aeróbica de humanos animais (GERMANO e GERMANO, 2008).

### 3.2.5 BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS

As bactérias psicotróficas são conhecidas por possuírem a capacidade de se multiplicarem em temperaturas de refrigeração, independente da temperatura ótima de crescimento das mesmas, a qual pode variar, devido ao metabolismo elevado, predominantemente lipoproteolítico. Estas bactérias podem apresentar-se como bastonetes, cocos, víbrios, podem formar ou não esporos, serem gram-negativas ou positivas, aeróbias ou anaeróbias (SORHAUG e STEPANIAK, 1997; VALSECHI, 2006; CARVALHO, 2010).

Os gêneros desses micro-organismos mais encontrados em alimentos são *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Vibrio*. Algumas bactérias são gram-positiva como *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* e *Micrococcus*. Dentre estas, várias são responsáveis pela diminuição da validade comercial de alimentos e sua consequente deterioração (COUSIN et al, 2001; VALSECHI, 2006; CARVALHO, 2010). Ainda estão presentes os gêneros *Listeria* e *Chromobacterium* (ENEROTH, AHRNÉ e MOLIN, 2000; TEH et al., 2011). No que se demonstram em outros estudos, as bactérias gram-negativas têm maior ocorrência dentre as bactérias psicotróficas (PINTO et al., 2006; SITOHY, MAHGOUB e OSMAN, 2011; TEH et al., 2012).

Entre os micro-organismos deteriorantes de produtos cárneos destacam-se os gram-negativos, os quais crescem na superfície do alimento, já os gram-positivos predominam no seu interior. A deterioração vem a causar alterações físicas, químicas e/ou organolépticas, modificando assim a aparência e propriedades dos produtos, por consequência do metabolismo dos micro-organismos presentes no alimento (TAVARES, 2002).

Em temperaturas de refrigeração e sob atmosfera aeróbica, a microbiota deteriorante predominante na carne é dada por *Pseudomonas* sp., já em

condições anaeróbias pelos *Lactobacillus* (LAWRIE, 2005). Quando a carne é embalada a vácuo ou é submetida a uma atmosfera modificada com mais de 20% de CO<sub>2</sub>, observa-se que o crescimento de *Pseudomonas* sp. é suprimido. Sob estas condições as bactérias lácticas crescem rapidamente (*Lactobacillus*, *Carnobacterium* e *Leuconostoc*) e são comumente os únicos micro-organismos detectáveis durante o armazenamento refrigerado em atmosfera modificada (HOLLEY e GILL, 2005).

Alguns dos defeitos causados pelos micro-organismos em condições aeróbicas são: a limosidade superficial; alteração na cor dos pigmentos da carne; rancificação; fosforescência; alterações na cor, no odor e sabor estranho (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A cor é o principal critério de qualidade que os consumidores utilizam na hora de comprar os produtos cárneos. No caso de carnes cozidas e curadas, os *Lactobacillus viridescens*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* produzem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podendo assim causar coloração esverdeada nos produtos. Esta alteração é oriunda pela reação da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com a mioglobina presente em carnes curadas. Devido ao fato deles gerarem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de oxigênio, a descoloração aparece quando esses produtos cárneos são expostos ao ar, logo após a abertura dos pacotes (SÄDE, 2011).

A ocorrência do limo superficial está relacionada com a temperatura de armazenamento e com a quantidade de água disponível no produto, sendo que alimentos com alta atividade de água e mantidos em temperatura de refrigeração normalmente apresentam essa alteração pela presença de *Pseudomonas alcaligenes*. Já em produtos com menor atividade de água, como os embutidos, os causadores deste defeito são os *Micrococcus* e as leveduras, e nos alimentos com menor atividade de água ainda, são os bolores (BANDEIRA, 2004). Os principais defeitos microbiológicos nas carnes curadas são a formação de limo superficial e o surgimento de bolores. Bactérias lácticas crescem à temperatura de refrigeração, na superfície dos produtos cárneos curados que apresentam umidade adequada. Não crescem se a superfície estiver seca. Logo, a umidade necessária ao crescimento bacteriano é a mesma que a superfície necessita para ter um bom aspecto (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

O esverdeamento do alimento também ocorre devido ao crescimento de micro-organismos no centro do produto, onde o baixo potencial redox propicia o

acúmulo de  $H_2O_2$ . Outras alterações na coloração de derivados cárneos podem ser oriundas de pigmentos bacterianos, produzidos pela *Serratia marcescens* ou qualquer outra bactéria produtora de pigmento vermelho. Leveduras produtoras de pigmentos podem ocasionar surgimento de diversas cores no produto: branco, creme, rosa ou marrom. Ainda, pontos brancos podem aparecer devido ao crescimento de vários bolores, sendo o *Sporotrichum carnis* o mais comum. Já os esporos verdes de diversas espécies de *Pencillium* provocam o aparecimento de pontos esverdeados (FORREST et al., 1979; DIKEMAN e DEVINE, 2014). O esverdeamento superficial bacteriano das carnes curadas é originado pelas más condições higiênicas durante o processamento ou armazenamento do produto elaborado (FARIA, 2001).

As bactérias ácido-lácticas psicotróficas constituem uma população relativamente importante da população microbiana em produtos cárneos embalados em atmosfera modificada. O crescimento elevado das mesmas pode provocar mudanças adversas sensoriais, tais como odores indesejáveis (BORCH, KANT-MUERMANS e BLIXT, 1996; VALSECHI, 2006; CARVALHO, 2010). A proliferação desse tipo de bactérias em embalagens a vácuo é favorecida devido a sua tolerância ao sal. O nitrito apresenta apenas um pequeno efeito inibidor no seu crescimento. Em geral os microrganismos dominantes são as bactérias ácido-lácticas (HOLLEY e GILL, 2005).

A verdadeira putrefação consiste na decomposição anaeróbia das proteínas, com a produção de substâncias que conferem odores desagradáveis como  $H_2S$  (ácido sulfídrico), indol, escatol, amônia, aminas, entre outros. Tal fato geralmente é associado à presença de *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Proteus* (BANDEIRA, 2004). Todavia, sob condições anaeróbicas, os *Clostridium* requerem temperaturas mais elevadas que as de refrigeração para o seu crescimento (PARDI et al., 2001).

### 3.3 FATORES QUE AFETAM O CRESCIMENTO MICROBIANO

É bastante difícil prever o quão rápido os micro-organismos irão se desenvolver, tal fato se dá pelos alimentos serem quimicamente complexos, a maioria deles apresenta nutrientes suficientes para tornar possível a multiplicação

bacteriana. Sendo assim, fatores relacionados com os alimentos podem propiciar, prevenir ou limitar a multiplicação microbiana nos alimentos (FORSYTHE, 2013).

Dentre os principais fatores que podem afetar o crescimento microbiano estão: composição nutricional, pH, relação entre tempo e temperatura do processamento, temperatura de armazenagem, disponibilidade de oxigênio e umidade (quantidade de água disponível) (HENNEKINNE, BUSYER e DRAGACCI, 2011; FORSYTHE, 2013). Estes parâmetros podem ser divididos em fatores intrínsecos e extrínsecos, detalhados na tabela 2.

**Tabela 2.** Parâmetros intrínsecos e extrínsecos que afetam a multiplicação microbiana

<b>Parâmetros Intrínsecos</b>	<b>Parâmetros Extrínsecos</b>
Atividade de água, identidade de umectantes	Temperatura
Disponibilidade de oxigênio	Umidade relativa
pH, acidez, identidade de acidulantes	Composição atmosférica
Capacidade de tamponagem	Embalagem
Nutrientes disponíveis	
Substâncias naturalmente antimicrobianas	
Presença e identidade da microbiota natural	
Forma coloidal	

Fonte: FORSYTHE, 2013

Ao adicionarem-se solutos no preparo dos alimentos, estes acabam por modificar as propriedades em que se encontrava a solução, isso faz com que os micro-organismos passem a competir com as moléculas de soluto pela água livre. O valor de atividade de água ( $a_w$ ) em geral é que estabelece o valor mínimo em que possa haver multiplicação bacteriana, isto faz com que essa propriedade venha sido utilizada com frequência como método de conservação, através da adição de sal ou açúcar no alimento e com isso reduzindo a água disponível necessária para multiplicação bacteriana. Cada micro-organismo possui uma faixa ótima de pH e temperatura, onde seu crescimento é máximo, a medida que vai se seguindo para os extremos do valor ótimo, há uma redução na multiplicação microbiana

(FORSYTHE, 2013). Alguns valores de atividade de água, pH e temperatura são ilustrados na tabela 3.

**Tabela 3.** Limites de multiplicação microbiana, atividade de água, pH e temperatura

<b>Micro-organismo</b>	<b>Faixa de pH</b>	<b>Mínima Atividade de Água (aw)</b>	<b>Faixa de Temperatura (°C)</b>
<i>L. monocytogenes</i>	4,4 – 9,4	0,920	-0,4 – 45
<i>Escherichia coli</i>	4,0 – 9,0	0,935	07 – 49,4
<i>Bacillus cereus</i>	4,3 – 9,3	0,930	04 – 52
<i>Lactobacillus spp.</i>	3,8 – 7,2	0,930	05 – 45

Fonte: FORSYTHE, 2013

Devido ao efeito inibidor do sal adicionado, nitrito e fumaça, as carnes curadas têm uma vida de prateleira maior quando comparadas com as carnes frescas. A adição de açúcar nas formulações de carnes curadas facilita as reações fermentativas, atrasando mudanças proteolíticas indesejáveis (HOLLEY e GILL, 2005).

### 3.4 ENZIMAS EXTRACELULARES

As enzimas extracelulares são produzidas pelas bactérias contaminantes durante a fase exponencial e estacionária do crescimento bacteriano (HADDADI et al., 2005). Este processo é influenciado pela concentração de oxigênio, *quorum sensing*, temperatura, teor de ferro e variação de fase de crescimento (BUCHON et al., 2000; NICODÈME et al., 2005).

Das principais enzimas extracelulares produzidas por bactérias contaminantes, destacam-se as enzimas proteolíticas e lipolíticas, as quais degradam respectivamente proteínas e lipídios (JAEGER et al., 1994; DEETH, 2006; MARTINS et al., 2006; NÖRBERG et al., 2011).

Os micro-organismos capazes de produzir enzima proteolítica, podem obter fonte de nitrogênio das mesmas, uma vez que a maior parte do nitrogênio contido nos alimentos é encontrado formando parte das proteínas. A proteólise ocorre através da quebra da proteína em peptídeos e aminoácidos. Os peptídeos obtidos da quebra têm sabor amargo, modificando o sabor original do alimento,



todavia este ainda não chega a ser desagradável. A decomposição de polipeptídios e aminoácidos em condições anaeróbicas acaba formando compostos sulfurados com odores desagradáveis oriundos da putrefação e formação de sulfetos de hidrogênio, metil-etil-mercaptano, compostos amoníacos e aminas (VALSECHI, 2006).

As lipases hidrolisam os triglicerídeos. Os produtos da reação são os ácidos graxos livres e mono e diglicerídeos e, em alguns casos, o glicerol. Por definição as lipases atuam na interface lipídeo-água de emulsões de cadeia longa (JAEGER et al., 1994; DEETH, 2006).

As enzimas lipolíticas produzem um sabor rançoso e a perda de propriedades funcionais, sendo uma constante preocupação para a indústria de alimentos (MARTINS et al., 2006; SHIMOKOMAKI et al., 2006).

Os principais micro-organismos responsáveis pela rancificação de produtos cárneos são as *Pseudomonas*, outros gram-negativos, *Bacillus*, leveduras e bolores. Substâncias eventualmente produzidas durante a oxidação (aldeídos e cetonas) e durante a hidrólise da gordura (ácidos graxos) podem ser responsáveis por sabor e odor estranhos. Outra alteração que ainda pode ocorrer em condições aeróbicas nos produtos cárneos é a fosforescência. Apesar de ser rara, é causada por bactérias luminescentes ou fosforescentes que crescem na superfície da carne, sendo um exemplo a *Photobacterium* (FRANCO e LANDGRAF, 2008). O fenômeno de fosforescência da carne deve-se à ação da enzima luciferase, contida nesta bactéria (BANDEIRA, 2004).

O odor e o sabor desagradáveis devem-se ao acúmulo de ácidos orgânicos durante a degradação enzimática de moléculas complexas por ação bacteriana (BANDEIRA, 2004).

### 3.5 BIOFILMES MICROBIANOS

Os biofilmes são uma das principais formas de vida microbiana em que uma única ou várias espécies de bactérias formam comunidades densamente povoadas, tipicamente enclausuradas numa matriz de um polímero que é secretado (COSTERTON, LEWANDOWISKI e CALDWELL, 1995; HALL-STOODLEY e STOODLEY, 2009; ABEE et al., 2011; STEENACKERS, HERMANS e VANDERLEYDEN, 2012; HOBLEY, HARKINS e MACPHEE, 2015) o qual

comumente se compõe de DNA, lipídeos, exopolissacarídeos e proteínas extracelulares, muitos dos quais apresentam propriedades semelhantes às amiloides (BRANDA et al, 2005; FLEMMING e WINGENDER, 2010).

O início da formação do biofilme se dá pela adesão de células bacterianas com moléculas orgânicas e inorgânicas depositadas em uma superfície, seguida pela adesão de microrganismos nesta estrutura pré-formada. Nessa fase, estruturas externas das bactérias (pili, fímbrias) formam uma ponte entre as células bacterianas e o substrato, gerando maior estabilidade (KUMAR e ANAND, 1998). Micro-colônias desenvolvem-se formando um biofilme maduro que está associado com a formação de exopolissacarídeo. Uma importante etapa no processo de maturação é a formação da arquitetura do biofilme, que se acredita ser controlada em resposta ao *quorum-sensing* (DAVEY e O'TOOLE, 2000).

A ubiquidade dos biofilmes está relacionada com a capacidade de colonização de micro-organismos tanto em superfícies bióticas, quanto abióticas. Isso sugere que viver em comunidade é um ponto crítico na existência e evolução bacteriana (HALL- STOODLEY, COSTERTON e STOODLEY, 2004). As bactérias que convivem no biofilme são capazes de tolerar danos físicos e químicos quando comparadas às células planctônicas e uma vez que essas bactérias podem se manter viáveis em diferentes superfícies, como as superfícies presentes em uma planta industrial, e dessa forma acabam sendo uma causa de grande perda econômica nos setores industrial e medicinal (DAVIES, 2003; CIOFU et al, 2015).

Os micro-organismos presentes no biofilme têm como vantagem a alta concentração de nutrientes e a facilidade de trocas genéticas, além disso, ainda possuem maior capacidade de suportar a falta de nutrientes, mudanças de pH e maiores concentrações de antibióticos em consequência da proteção fornecida pelo exopolissacarídeo (PALMER et al., 2007).

Esse atributo de maior resistência ao estresse químico fornecido pelo biofilme tem sido observado na presença de várias bactérias de espécies diferentes, ou seja, biofilme multiespécies (SCHWERING et al., 2013). O número de bactérias encontradas normalmente formando biofilmes varia de  $10^4$  a  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup> (TEH et al., 2012).

Dentre as fontes de contaminação dos alimentos destacam-se as falhas nos processos de higienização de superfícies e equipamentos, que favorecem a

adesão e formação de biofilme microbiano, fato que tem maior preocupação quando se trata de alimentos armazenados por longos períodos em temperatura de refrigeração. As bactérias presentes em biofilmes podem promover a recontaminação de um alimento e algumas dessas produzem enzimas termorresistentes. E ainda, mesmo que após tratamento térmico, os microorganismos sejam inativados, as enzimas ativas residuais poderão resultar em alterações nas propriedades dos produtos. Tanto a ação dessas enzimas quanto a formação de biofilme e conseqüentemente a resistência a agentes antimicrobianos é controlada pelo sistema de autoindução ou *quorum sensing* (MARQUES, 2008).

### 3.6 COMPOSTOS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Cada vez mais, observa-se a procura do consumidor por não só a obtenção de um alimento seguro em termos microbiológicos, mas ainda que esse seja o mais natural e ecológico possível. Com isso houve um incremento nos estudos e pesquisas por antimicrobianos naturais que possam eliminar ou pelo menos reduzir patógenos que possam ser veiculados nos alimentos e ainda que também sejam capazes de substituir sanitizantes usados industrialmente, e que ainda tragam algum benefício para a saúde do consumidor (GRAHAM, 1997; CHERRY, 1999; BENECH et al., 2002; HERNÁNDEZ, CARDELLE e ZÁRATE, 2005; FORSYTHE, 2013). Os compostos obtidos a partir de plantas, extratos e óleos essenciais de ervas e especiarias têm demonstrado uma boa capacidade e efeito antimicrobiano (GUPTA & RAVISHANKAR, 2005; UHART, MARKS e RAVISHANKAR 2006; FRIEDMAN et al, 2009; RAVISHANKAR et al, 2008, 2009, 2010) e ainda são considerados como substâncias seguras, tornando-se populares na indústria alimentícia.

#### 3.6.1 Extrato de Hibisco

Há um crescente interesse na busca da substituição de conservantes artificiais por conservantes naturais nos alimentos, sendo que as substâncias de origem vegetal tornam o alimento mais atrativo aos olhos do consumidor (PEREIRA et al, 2006) e ainda aumentam a vida de prateleira do produto através de suas substâncias bactericidas e ou bacteriostáticas (SARTORATTO et al, 2004), como se observa no hibisco.

O hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) é uma espécie vegetal da família *Malvaceae* proveniente da África Oriental, que pode atingir mais de 1,80 metros de altura, pouco ramificado e em forma de taça de tonalidade avermelhada (MARTINS et al, 2000). O hibisco é uma planta comestível, suas sementes, folhas, frutos e raízes podem ter várias aplicações, incluindo o ramo alimentício, no qual se utilizam os cálices vermelhos da planta, os quais podem ser utilizados para produzir vinhos, geleias, xaropes, pudins, bolos, sorvetes e chás. Essa planta é um alimento funcional em alguns países da Ásia, usada na medicina para prevenir hipertensão e inflamação, tem propriedades diuréticas, antioxidantes e antineoplásicas (CHEWONARIN, KINOUCI e KATAOKA, 1999; ONYENEKWE et al, 1999; WANG et al, 2000; SALLEH et al, 2002). As flores desidratadas dessa planta possuem antocianinas (gossipectina e hibiscina), as pétalas contêm flavonoides (glucosídeo de hibiscritina) e ácidos polifenólicos, os cálices são ricos em riboflavina, ácido ascórbico, niacina, caroteno, cálcio e ferro (DUKE, 1983; WANG et al, 2000). Segundo Chao & Yin (2009) há uma possível relação entre a quantidade de antocianinas e a atividade antimicrobiana do hibisco.

Tanto o extrato aquoso quanto o etanólico são considerados seguros para utilização em sistema de alimentação com a finalidade de evitar contaminação bacteriana. O cálice da planta contém ácido protocatecuico e outros compostos fenólicos como as antocianidinas e ácidos hidroxicinâmicos. É possível que esses compostos fenólicos estejam relacionados com o efeito antimicrobiano observado (FAROMBI e FAKOYA, 2005; SÁYAGO-AYERDI et al, 2007).

Alguns trabalhos já empregaram o extrato aquoso de hibisco para avaliar seu potencial controle e ou inibição de bactérias de origem hospitalar como *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (LIU, TSAO e YIN, 2005). O extrato alcoólico obtido dos cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. mostrou efeito antibacteriano frente a *S. aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia mscances*, *Clostridium sporogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescens*. A atividade antibacteriana do hibisco pode ser comparada a da estreptomicina, todavia essa não inibe *E. coli* (OLALEYE, 2007). Chao e Yin (2009) demonstram que tanto o extrato aquoso quanto o etanólico obtidos do cálice de hibisco foram capazes de inibir *Salmonella Typhimurium*, *E. coli*,

*Listeria monocytogenes*, *S. aureus* e *Bacillus cereus*, bactérias estas que podem ser veiculadas por alimentos.

### 3.6.2 Bacteriocinas

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente por vários grupos de bactérias, apresentam atividade antimicrobiana contra uma ampla extensão de micro-organismos, os quais podem ser gram-positivos e gram-negativos (BENECH et al., 2002; HERNÁNDEZ, CARDELLE e ZÁRATE, 2005). Sua função biológica é a inibição do crescimento de outros micro-organismos competitivos que por ventura estejam disputando nutrientes num mesmo ambiente (NES e HOLO, 2000).

Segundo Rodgers, (2001), as bacteriocinas são efetivas em baixa concentração e não modificam as características sensoriais do produto em que elas são incorporadas, em consequência disso, há um crescente interesse por parte da indústria alimentícia sobre o potencial e utilização destes compostos em substituição aos conservantes químicos convencionais.

As bacteriocinas podem ter atividade contra vários micro-organismos, como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. e *Mycobacterium* spp., e ainda podem inibir células vegetativas e esporos de *Bacillus* sp. e *Clostridium* sp. (PRANOTO, RAKSHIT e SALOKHE, 2005; SAMELIS et al., 2005; ESPITIA et al., 2013). Podem atuar na dissipação do gradiente de pH e no potencial de membrana das células alvo, assim causando efluxo de aminoácidos, minerais e de energia (BONNET e MONTVILLE, 2005).

A molécula de pediocina é pequena, pertence a classe IIa das bacteriocinas, é codificada por plasmídeo e produzida pelo gênero *Pediococcus* (PAPAGIANNI, 2003). Essa bacteriocina tem propriedade antilisteria, ou seja, é capaz de inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* (FERNANDEZ, SAVARD e FLISS, 2015). Pediocinas são termoestáveis, atuam em uma ampla faixa de pH, todavia são sensíveis a ação de enzimas proteolíticas, como papaína, pepsina, protease e tripsina (KUMAR et al, 2011). Existem vários tipos de pediocinas, como AcH, AcM, CP-2, F, K1, L, L50, SJ1 entre outras (PAPAGIANNI e ANASTASIADOU, 2009; KUMAR et al, 2011; LOHANS e VEDERAS, 2012).

Podem ser introduzidas na produção de alimentos por pelo menos três diferentes métodos: em alimentos fermentados podem ser produzidas pela adição de culturas lácticas bacteriocinogênicas no lugar das tradicionais culturas iniciadoras; pela adição destas culturas como adjuvantes; ou pela adição direta de bacteriocinas purificadas (NASCIMENTO, MORENO e KUAYE, 2008).

As condições de processamento e estocagem, como pH e temperatura do produto podem afetar adversamente a ação das bacteriocinas. Por exemplo, o valor de pH ótimo para produção de bacteriocina (5,5) não coincide com o valor ótimo para o desenvolvimento microbiano (6,5) (DROSINOS et al., 2005).

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

A coleta das amostras para avaliação da qualidade microbiológica do presunto cozido fatiado foi realizada em 4 bancas (Banca A, Banca B, Banca C e Banca D) integrantes do Mercado Público da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Para contagem de micro-organismos mesófilos e psicotróficos, pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. foram coletadas 2 amostras de presunto por banca, totalizando 8 amostras no período de Maio a Junho de 2015. Para o tratamento do presunto com extrato de hibisco e pediocina, foram realizadas 2 coletas: uma para o tratamento que ficou continuamente em contato com o alimento e outra para o tratamento que permaneceu em contato com o presunto durante 1 hora e 40 minutos, ambas dentro do período de Fevereiro a Março de 2016. As coletas de suabes do mercado público foram conduzidas também nesse período de 2016, assim como o presunto coletado para quantificação de coliformes fecais e totais.

##### 4.1 CONTAGEM DE BACTÉRIAS MESÓFILAS E PSICOTRÓFICAS EM PRESUNTO COZIDO FATIADO

O procedimento de contagem de micro-organismos mesófilos seguiu a metodologia descrita por Silva et al. (2010), com adaptações: Pesaram-se 25 g (Balança Marte® - AD 2000) de amostra em um saco estéril e acrescentaram-se 225 mL de água peptonada tamponada (APT - Merck®) para homogeneização durante 60 segundos. Após isso, retirou-se uma alíquota de 1 mL para realização das diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) em 9 mL de solução salina 0,85% estéril.

Após foi inoculado 0,1 mL de cada diluição em meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA - Kasvi®), com auxílio da alça de *Drigalski*. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (DeLeo®) sob uma temperatura de 37°C durante 24-48 horas. Após esta etapa, foram selecionadas as placas contendo entre 25 a 250 colônias para contagem e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

A contagem de microrganismos psicotróficos foi realizada conforme a metodologia indicada pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), do Ministério da Agricultura, Pecuária, Abastecimento (BRASIL, 1992). Partiu-se das

mesmas diluições realizadas para a contagem de mesófilos. A semeadura pelo método da superfície foi feita sobre o meio de cultura ágar PCA (Kasvi®), e as placas foram incubadas à aproximadamente 7°C durante 10 dias. Após este período, foram selecionadas as placas com as diluições que possuíam entre 25 a 250 colônias para contagem e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Os experimentos foram realizados em duplicata.

#### 4.2 PESQUISA DE *Listeria monocytogenes* EM PRESUNTO COZIDO FATIADO

O isolamento desse patógeno seguiu a metodologia descrita por Silva et al. (2010) que detalha a metodologia empregada na ISO 11290-1:1996 *amendment* 1:2004.

##### 4.2.1 Enriquecimento Primário

Pesaram-se 25 g da amostra em um saco estéril e adicionaram-se 225 mL de caldo *Half Fraser* (AES®). Posteriormente homogeneizou-se durante 60 segundos. A amostra foi incubada a 30°C por 24 horas.

##### 4.2.2 Enriquecimento Secundário

Retirou-se uma alíquota de 0,1 mL do caldo *Half Fraser* e transferiu-o para um tubo contendo 9,9 mL de caldo *Fraser* (AES®), o qual foi incubado a 35°C por 24-48 horas (conforme o escurecimento do meio de cultura).

##### 4.2.3 Plaqueamento Diferencial

Para amostras suspeitas no caldo Fraser, retirou-se uma alçada para semeadura em meio ágar *Listeria* de Ottaviani e Agosti (ALOA- AES®), o qual foi incubado à 35°C durante 24-48 horas, para observação de colônias características. Após o crescimento, escolheram-se três dessas colônias para semeadura em ágar *Brain Heart Infusion* acrescido de 1% de extrato de levedura (BHI-YE - Himedia®), sendo incubado a 37°C durante 24 horas, com o objetivo de purificação das colônias.

##### 4.2.4 Identificação dos Isolados

Para identificação dos isolados foram realizados os testes de fermentação de açúcares (rhamnose, manitol e xilose) através do ágar púrpura base para



carboidratos (Himedia®) acrescido de 1% de açúcar, também foi realizado o CAMP test (ágar sangue - Himedia®) e o teste da motilidade (Himedia®). As culturas identificadas preliminarmente como *Listeria monocytogenes* foram encaminhadas ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) para sorotipificação.

#### 4.3. PESQUISA DE *Salmonella* sp. EM PRESUNTO COZIDO FATIADO

O isolamento desse patógeno seguiu a metodologia descrita por Silva et al. (2010) que detalha a metodologia empregada de acordo com BAM/FDA (2007), com adaptações.

##### 4.3.1 Pré-enriquecimento

Pesaram-se 25 g da amostra em um saco estéril e adicionaram-se 225 mL de água peptonada tamponada 0,1 % (MERCK®). Posteriormente homogeneizou-se durante 60 segundos. A amostra foi incubada a 37°C por 24 horas.

##### 4.3.2 Enriquecimento Seletivo

Retirou-se uma alíquota de 0,1 mL da água peptonada tamponada e transferiu-a para um tubo contendo 10 mL de caldo *Rappaport-Vassiliadis* (BD-Difco®), o qual foi incubado em banho-maria (DeLeo®) à 42°C por 24 horas. Paralelamente a isso, uma alíquota de 1 mL foi retirada também da água peptonada tamponada e foi adicionada em 10 mL de caldo tetracionato (Accumedia®) o qual foi levado à incubação de 37°C durante 24 horas.

##### 4.3.3 Plaqueamento Diferencial

Uma alçada, tanto do meio caldo tetracionato, quanto do meio caldo *Rappaport-Vassiliadis* foi transferida e semeada em ágar *Xylose-Lysine-Deoxycholate* (XLD – BD-Difco®), ambos incubados a 37°C durante 24 horas. Após o crescimento, de colônias características, escolheram-se três dessas colônias para semeadura em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI - Kasvi®), sendo incubado a 37°C durante 24 horas, com o objetivo de purificação das colônias.

#### 4.3.4 Identificação dos Isolados

Após a obtenção de colônias puras e isoladas, fez-se a identificação bioquímica das mesmas, utilizando os testes bioquímicos: TSI (*Triple Sugar Iron - Kasvi*®), SIM (sulfeto, indol e motilidade - Himedia®), Citrato de *Simmons* (Himedia®), produção de urease (*Vetec*®), LIA (*Lysine Iron Agar - Himmedia*®).

Os isolados que se portaram bioquimicamente como *Salmonella* sp. foram submetidos ao soro polivalente anti-*Salmonella* (Probac®) para verificação de aglutinação e confirmação da espécie.

#### 4.4 CONTAGEM E PESQUISA DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS, BACTÉRIAS MESÓFILAS E PSICROTRÓFICAS EM PRESUNTO COZIDO INTEIRO

Foi adquirido um presunto cozido inteiro, sem sofrer violação de sua embalagem original para realização da Contagem de mesófilos e psicotróficos (conforme o item 4.1); Pesquisa de *L. monocytogenes* (conforme item 4.2); Pesquisa de *Salmonella* spp. (conforme item 4.3) e Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva. Para realização da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, seguiu-se a metodologia indicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de acordo com a Instrução Normativa número 62, de 26 de Agosto de 2003: pesaram-se 25 g da amostra em um saco estéril, e adicionaram-se 225 mL de água peptonada tamponada 0,1% (MERCK®). Posteriormente homogeneizou-se durante 60 segundos e então uma alíquota de 0,1 mL foi retirada e plaqueada em ágar *Baird-Parker* (Himedia®) acrescido de gema de ovo com telurito 0,1% (NewProv®). As colônias características foram repicadas em meio BHI e após o isolamento foram submetidas à coloração de Gram, ao teste de produção de catalase e ao teste da coagulase. Para a Prova da Coagulase foram empregados 0,3 mL do cultivo de cada isolado a 0,3 mL de plasma de coelho (NewProv®). Foram lidos os tubos de coagulase imediatamente após a adição de plasma, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 6 horas após a adição do mesmo para verificar a formação de coágulo, sendo que durante esses intervalos as amostras ficaram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica. Foi utilizada a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como controle positivo.

Foram coletados vários pontos distintos, tanto na superfície da peça cárnea, quanto no seu interior, com a finalidade de contemplar todas as partes da peça, como ilustra a Figura 1. As contagens foram feitas em duplicata e esse experimento foi realizado em duplicata.



**Figura 1.** Análise de presunto cozido inteiro

#### 4.5 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS DE PRESUNTO COZIDO FATIADO

As bactérias que se desenvolverem sob as condições descritas no item 4.1, foram consideradas psicrótroficas e posteriormente selecionadas. As colônias foram observadas com auxílio de uma lupa, possibilitando a observação de diferentes morfologias coloniais. Estas colônias foram repicadas em meio ágar BHI, na forma de esgotamento, para isolar colônias, incubando-se a 25°C durante 48 horas. Também se verificou a capacidade desses isolados quanto ao crescimento a temperatura de 35°C.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA DAS BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS

Para a avaliação da atividade proteolítica, as culturas foram inoculadas por picada em duplicata em placas contendo ágar leite (TSB - Himedia® + 10 % de leite UHT desnatado + 1,5 % de ágar) e incubadas em temperatura de 30°C por 48 horas. Para o controle positivo foi inoculado uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (FRAZIER; RUPP, 1928; MONTANHINI; BERSOT, 2013).

Quanto à determinação da atividade lipolítica, as culturas foram inoculadas em duplicata em placas de vidro contendo ágar tributirina (20 g de ágar; 0,5 g de proteose peptona (Himedia®) 2,5 g de peptona de caseína (Organotechnie®); 3,0 g de extrato de levedura (Himedia®); 10 mL de tributirina; 1L de água destilada) e foram incubadas em 25°C por 48 horas (MONTANHINI; BERSOT, 2013). Para o controle positivo foi inoculada uma cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS PELAS BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS

A produção de exopolissacarídeos (EPS) foi determinada pelo cultivo desses micro-organismos em ágar vermelho congo (CRA) através do uso de 0,8 g de corante vermelho congo (Dinâmica®) para 1 L de ágar BHI (Himedia®) e 50 g de sacarose (FREEMAN et al., 1989). Com isso, as placas de ágar vermelho congo foram inoculadas e incubadas a 25°C por 48 horas. A produção de colônias rugosas e pretas caracteriza a produção de EPS, diferenciando de culturas não produtoras de EPS as quais apresentaram colônias lisas e vermelhas. A cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 foi utilizada como controle positivo.

#### 4.8 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS SELECIONADAS E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A identificação foi baseada em métodos moleculares e seguiu a metodologia proposta por Riggio et al. (2011), Kusumaningrum et al. (2003) e Song et al. (2000). Duas colônias puras de psicotróficos produtores de exopolissacarídeo e com atividade lipoproteínolítica tiveram o DNA da região 16S extraído seguindo o protocolo de extração do *PowerSoil™ DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories®). Após visualização das bandas de DNA em gel de agarose através de um transiluminador, programou-se o termociclador para realização da reação de PCR, amplificando por volta de 500 nucleotídeos do DNA desejado. Logo após o DNA foi purificado utilizando um kit comercial ExoSAP-IT® (Affimetrix-USB®) e então foi enviado para empresa *Ludwig Biotec* para a prestação do serviço de sequenciamento.

Foi realizada a avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de acordo com metodologia de disco-difusão descrita pelo CLSI (2013), sendo utilizados os seguintes antimicrobianos: amicacina 30 µg (AMI), ampicilina 10 µg (AMP), ceftazidima 30 µg (CAZ), ciprofloxacina 05 µg (CIP), cloranfenicol 30 µg (CLO), eritromicina 15 µg (ERI), imipenem 10 µg (IPM), norfloxacina 10 µg (NOR), tetraciclina 30 µg (TET), cefalotina 30 µg (CFL), cefepima 30 µg (CPM), gentamicina 10 µg (GEN), levofloxacina 05 µg (LVX), meropenem 10 µg (MER), penicilina 10 un (PEN), piperacilina com tazobactam 100/10 µg (PPT) e tobramicina 10 µg (TOB).

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES PELAS BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS

Os testes de formação de biofilme *in vitro* utilizado no presente estudo seguiu a metodologia descrita por Stepanovic et al. (2007), com modificações. Para o teste, selecionaram-se 2 isolados psicrotróficos que apresentaram atividade lipoproteínolítica e produção de exopolissacarídeo e mais 2 isolados de *Listeria*. Estes isolados foram previamente inoculados em placas contendo ágar BHI e incubados a 20°C por 48 horas.

Placas de microtitulação estéreis (96 poços) foram preenchidas com 180 µL de caldo TSB (Himedia®) acrescido de 1,0% de extrato de carne juntamente com 0,75% de glicose (Dinâmica®). Também se utilizaram placas de microtitulação as quais foram preenchidas com 180 µL de caldo TSB acrescido de 1% de extrato de carne sem a adição de glicose. As colônias foram ressuspensas em solução salina e ajustadas conforme escala 0,5 de *McFarland*, e 20 µL dessa solução foi inoculada em cada poço, sendo que 8 poços foram utilizados para cada isolado, desse modo, cada isolado foi analisado 8 vezes quanto a formação de biofilme. Para o controle negativo, a primeira coluna de cada microplaca foi inoculada somente com TSB acrescido de glicose ou TSB acrescido de extrato de carne, seguido de outros poços semeados com o controle positivo *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 25923) o qual é forte formador de biofilme. As placas de microtitulação foram fechadas e incubadas 25°C por 48 horas, para permitir a fixação das células e formação de biofilmes.

O caldo TSB com crescimento bacteriano foi aspirado com micropipeta multicanal (8 canais), e os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de solução de

salina estéril a uma concentração de 0,85%. A fixação das bactérias foi realizada com 200 µL de metanol P.A. (VETEC) em cada poço da microplaca durante 20 minutos, em seguida as microplacas foram mantidas invertidas, até a secagem. Em seguida as amostras foram coradas com 200 µL de Cristal Violeta 0,5% (Dinâmica®) durante 15 minutos, seguido de lavagem da placa com água destilada estéril. Após a secagem das placas, o botão corado fixado ao fundo dos poços foi ressuspendido em 150 µL de etanol 95% (VETEC). As microplacas foram mantidas em repouso durante 30 minutos e então foi realizada a quantificação dos biofilmes.

A quantificação da capacidade de formação dos biofilmes foi feita pela avaliação da densidade óptica (D.O) dos biofilmes bacterianos, com auxílio de um leitor espectrofotômetro de microplacas com comprimento de onda de 450 nm (Marca: Anthos 2010 Type 17 550 S. Nº 17 550 4894). Os isolados foram classificados seguindo os critérios descritos por Christensen et al., (1985) e Chusri, Phatthalung e Voravuthikunchai (2012). A D.O média do controle negativo foi o ponto de corte. Os isolados foram classificados da seguinte forma:

- Não formadores de biofilme: amostras cuja D.O foi menor que o ponto de corte.
- Fracos formadores de biofilme: amostras com D.O média acima do ponto de corte, porém menos ou igual ao dobro do PC.
- Moderados formadores de biofilmes: amostras com D.O média acima do dobro do PC, porém menor ou igual a 4x o PC.
- Fortes formadores de biofilme: amostras com D.O média maior do que 4x o valor do PC.

$DO \leq DOc$  Não-aderente

$DOc < DO \leq 2 \times DOc$  Fraco aderente

$2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$  Moderado aderente

$4 \times DOc < DO$  Forte aderente

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA ADESÃO EM AÇO INOXIDÁVEL PELOS ISOLADOS PSICROTRÓFICOS

O ensaio de adesão dos isolados selecionados foi realizado usando um modelo *in vitro* para simular a superfície de contato com o aço inoxidável (AISI 304) com superfícies de 1 cm<sup>2</sup>, adaptado de Nörnberg et al (2011) e Bayoumi et al (2012).

Para o preparo do pré-inóculo, os isolados selecionados foram submetidos ao crescimento em meio líquido TSB (Himedia®) acrescido de 1% de extrato de carne (Himedia®). Para os ensaios, um volume de 1 mL do pré-inóculo da cultura de interesse com concentração inicial de células igual a escala 0,5 de *McFarland* foi inoculado em 4 mL de caldo TSB (Himedia®) adicionado de 1% de extrato de carne (Himedia®) em tubos *Falcon*® de 50mL, cada um contendo um corpo de prova de aço inoxidável esterilizado. Os tubos foram incubados a 20°C por 24 horas. O experimento foi realizado em duplicata.

Para o procedimento de contagem bacteriana total, os corpos de prova foram retirados com auxílio de uma pinça previamente flambada em álcool e então lavados através da imersão em água destilada estéril por três vezes consecutivas para remover as células fracamente aderidas. Depois de enxaguados os corpos de prova foram transferidos para 10 mL de solução salina 0,85% e foram submetidas a um banho ultrassônico (Ultrasonic, USC 700, Inique) com frequência de 40kHz durante 10 minutos. Após isso diluições seriadas foram realizadas em solução salina 0,85% e plaqueadas em meio PCA (Kasvi®) onde foram incubadas 20°C por 24 horas. As colônias foram contadas e a quantificação foi expressa em unidades formadoras de colônias por centímetro quadrado (UFC/cm<sup>2</sup>).

#### 4.11 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS, MESÓFILAS E PATOGÊNICAS EM PRESUNTO COZIDO FATIADO, TRATADOS COM PEDIOCINA E EXTRATO DE HIBISCO

Este experimento objetivou avaliar o efeito da bacteriocina pediocina e do extrato de hibisco sobre o desenvolvimento das bactérias psicrotróficas, mesófilas, coliformes, *Listeria* sp. e *S. aureus* em presunto cozido fatiado conservados sob refrigeração. Para este trabalho foi utilizada a bacteriocina pediocina ALTA™2345 (Kerry®) e o extrato alcoólico de Hibisco (*Hibiscus sabdarifa*), adquirido de uma farmácia de manipulação (ABC Pharmus manipulação).

##### 4.11.1 Avaliação da Capacidade Inibitória de Pediocina e Hibisco

Com o objetivo da obtenção de uma concentração dos compostos antimicrobianos utilizados nos tratamentos do presunto cozido fatiado, foram feitas

diluições dos mesmos e testadas *in vitro* perante a bactérias escolhidas (indicadoras), detalhadas a seguir:

Para pediocina, foram feitas 2 diluições, sendo de 0,5% e 1,0%. Utilizaram-se as bactérias *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, 2 espécies de *Listeria* spp. e 2 isolados psicotróficos selecionados dos experimentos anteriores para realização desse teste. Cada bactéria foi semeada em uma placa de ágar Müeller –Hilton (Kasvi®) e 20 µL de cada diluição de pediocina foram aplicados dispersamente na superfície da placa, em sextuplicata. Após incubação a 37°C durante 24 horas, foi realizada a leitura das placas através da observação ou não da formação de halos translúcidos. Nos casos onde houve formação de halo, o mesmo foi medido e expresso em milímetros (mm).

Para o extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus Sabdarifa*) foi realizado o mesmo procedimento, todavia testado nas concentrações de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%. Como bactérias indicadoras tiveram-se *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 10536 e 2 isolados psicotróficos selecionados de testes anteriores. Cada diluição foi testada em triplicata.

#### 4.11.2 Avaliação da Vida de Prateleira e Microbiota Mesófila, Psicotrófica e Patogênica Presente em Presunto Cozido Fatiado Submetido a Tratamentos de Pediocina e Hibisco

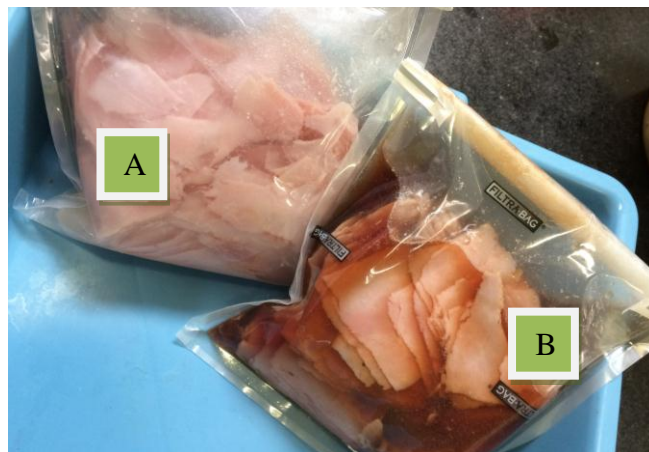
Foram empregadas amostras de presunto cozido fatiado obtidas do mercado público (Banca C) e foram constituídos 3 grupos, os quais ficaram submersos em tempo contínuo (durante todo o ensaio de 12 dias, permanecendo em temperatura de refrigeração) no tratamento de acordo com Paim et al (2015): **Grupo 1 Controle:** amostra de presunto cozido fatiado (sem adição de bacteriocina/hibisco e submersa em água destilada estéril); **Grupo 2 Tratado H:** amostra de presunto cozido fatiado submersa com extrato de hibisco a 40% e **Grupo 3 Tratado P:** amostra de presunto cozido fatiado submersa em pediocina 0,5%, como demonstra a figura 2.





**Figura 2.** Divisão dos grupos de presunto antes de receberem os tratamentos com pediocina e extrato de hibisco

Também foram realizados outros tratamentos, que seguiram de acordo com Barros, Kunigk e Jurkiewicz (2010) que submergem o alimento no tratamento durante 1 h e 40 minutos. Assim obtiveram-se 4 grupos: **Grupo 1 Controle:** amostra de presunto cozido fatiado (sem adição de bacteriocina/hibisco e submersa em água destilada estéril); **Grupo 2 Tratado X:** amostra de presunto cozido fatiado submersa em pediocina 1,0%; **Grupo 3 Tratado Y:** amostra de presunto cozido fatiado submersa em pediocina 0,5% e **Grupo 4 Tratado Z:** amostra de presunto cozido fatiado submersa em extrato de hibisco 40%, como demonstra a figura 3.



**Figura 3.** Tratamento do presunto com pediocina 1,0% (A) e com extrato de hibisco 40% (B).

Aproximadamente 250 g de presunto cozido fatiado foram empregados para avaliação de cada tratamento. Após os tratamentos foram feitas contagens para a determinação de unidades formadoras de colônias de bactérias em ágar PCA. Os experimentos foram feitos em quintuplicata (psicrotróficos e mesófilos) e em duplicata (*Listeria* spp., coliformes e *S. aureus*). As contagens foram feitas nos dias 0 (antes do tratamento), 2, 5 e 12 sendo que as amostras ficaram mantidas sempre em refrigeração (4 - 8°C).

Foram realizadas contagens de *Listeria* spp. em ágar ALOA, (incubadas por 48 horas a 30°C), de *E. coli* em ágar *Eosin-Methylene Blue* (EMB - Himedia®) incubadas por 48 horas a 37°C, de *S. aureus* em ágar *Baird-Parker* (Himedia®), incubadas por 48 horas a 37°C, de micro-organismos mesófilos em ágar PCA (incubadas por 48 horas a 37°C) e de micro-organismos psicrotróficos em ágar PCA (incubadas por 10 dias em temperatura de refrigeração 4 - 8°C). Para cada uma das análises os resultados foram expressos em unidades UFC/ml.

#### 4.12 CONTAGEM E PESQUISA DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS, BACTÉRIAS MESÓFILAS E PSICROTRÓFICAS OBTIDAS DE SUABES DE SUPERFÍCIE

As coletas previstas nesta metodologia foram todas realizadas nas Bancas (A, B, C e D), local de onde os presuntos cozidos fatiados foram inicialmente coletados (item 4.1) no Mercado Público de Porto Alegre-RS, no período de Março de 2016.

Seguiu-se a metodologia descrita por Silva et al (2010), que menciona a ISO 6887-1 (1999) a qual descreve o procedimento de coleta de suabes em superfície. Foram coletados 32 suabes, sendo 8 de cada banca (2 do fatiador de alimentos, 2 da superfície de contato com o alimento e 2 de utensílios destinados ao manuseio de alimentos (como faca e espátula) e 2 da mão de um manipulador).

No momento da coleta, o suabe estéril foi retirado de sua embalagem, submergiu-se a ponta de algodão em um tubo de ensaio contendo 10 mL de água peptona tamponada 0,1% estéril. Então se utilizou um molde quadrado vazado de 5 cm de aresta (previamente tratado com álcool 70°) para delimitação do local de contato com o suabe, sendo este aplicado com certa pressão de baixo para cima, da

direita para esquerda e diagonalmente, em movimentos rotatórios. O suabe foi transferido para o tubo de ensaio.

Os suabes foram mantidos em caixa de isopor até a chegada ao laboratório, onde as amostras coletadas foram processadas como segue: o tubo de ensaio com suabe submerso foi considerado como diluição  $10^{-1}$  e 1 mL do mesmo foi retirado e transferido para um tubo contendo 9 mL de solução salina 0,85% estéril para obtenção da diluição  $10^{-2}$ . Com isso, 100  $\mu$ L de cada diluição foi plaqueado em duplicata em ágar PCA (contagem de mesófilos e psicrotróficos), em ágar ALOA, em ágar *Baird-Parker* e em ágar *chromocult* para coliformes, sendo todos incubados a 37°C durante 24-48 horas com exceção dos psicrotróficos que foram incubados a 7°C durante 10 dias. Após o plaqueamento, os tubos de ensaio contendo os suabes submersos foram encaminhados para estufa bacteriológica (DeLeo®) durante 24 horas para dar sequência à pesquisa de *Salmonella* spp., conforme o item 4.3.

Para a Pesquisa de *L. monocytogenes*, os suabes foram coletados separadamente e submersos em caldo *Half-Fraser* e transportados para o laboratório em refrigeração. Ao chegarem ao laboratório estes foram incubados a 30°C durante 24 horas e seguiu-se a metodologia descrita no item 4.2.

A coleta de suabes das mãos de manipuladores de alimentos foi feita de acordo com Hattori e Klaus (2013) que seguem a recomendação da *American Public Health Association*, com consentimento dos funcionários. Os suabes foram coletados após a higienização das mãos dos operadores e os valores foram expressos em unidades formadoras de colônias por mão de operador (UFC/mão). O processo de coleta e laboratorial segue o mesmo descrito por Silva et al (2010) para suabe de superfície. Esta avaliação teve um caráter mais qualitativo, pois não houve uma delimitação (em  $\text{cm}^2$ ) da área da mão a ser coletada.

Também houve uma nova coleta de presuntos nesse mesmo dia para obtenção de valores de coliformes totais e fecais. O procedimento de contagem de coliformes totais e fecais seguiu a metodologia descrita por Silva et al. (2010), com adaptações: Pesaram-se 25 g (Balança Marte® - AD 2000) de amostra em um saco estéril e acrescentaram-se 225 mL de água peptonada tamponada (APT - Merck®) para homogeneização durante 60 segundos. Após isso, retirou-se uma alíquota de 1 mL para realização das diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) em 9 mL de solução salina 0,85% estéril. Após foi inoculado 0,1 mL de cada diluição em meio de cultura

*chromocult* para coliformes (Merck®), com auxílio da alça de *Drigalski*. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (DeLeo®) sob uma temperatura de 37°C durante 24-48 horas. Após esta etapa, foram selecionadas as placas contendo entre 25 a 250 colônias para contagem e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CONTAGEM DE BACTÉRIAS MESÓFILAS E PSICOTRÓFICAS EM PRESUNTO COZIDO FATIADO

Foram realizadas contagens em duplicata de micro-organismos mesófilos e psicotróficos em presunto cozido fatiado, vendidos em 4 bancas (identificadas como A, B, C e D) do Mercado Público de Porto Alegre. Foram coletadas 2 amostras do alimento por banca, totalizando 8 amostras. Os resultados obtidos podem ser visualizados na tabela 4.

**Tabela 4.** Contagem bacteriana de micro-organismos mesófilos e psicotróficos encontrados em presunto cozido fatiado.

	Mesófilos (UFC/mL)	Mesófilos (Log <sub>10</sub> /mL)	DP Meso.	Psicotróficos (UFC/mL)	Psicotróficos (Log <sub>10</sub> /mL)	DP Psicot.
<b>Banca A</b>	5,9x10 <sup>5</sup>	5,77	1,212	8,1x10 <sup>5</sup>	5,91	1,012
<b>Banca B</b>	3,3x10 <sup>4</sup>	4,52	0,870	2,1x10 <sup>4</sup>	4,32	0,070
<b>Banca C</b>	3,6x10 <sup>4</sup>	4,55	0,325	3,1x10 <sup>5</sup>	5,50	0,455
<b>Banca D</b>	4,5x10 <sup>4</sup>	4,65	1,414	3,8x10 <sup>5</sup>	5,58	1,768

Legenda: DP: desvio padrão

A contagem de mesófilos em presunto cozido fatiado variou entre 4,52 Log<sub>10</sub>/mL (3,3 x10<sup>4</sup>UFC/mL) a 5,77 Log<sub>10</sub>/mL (5,9 x10<sup>5</sup> UFC/mL) e a de psicotróficos variou entre 4,32 Log<sub>10</sub>/mL (2,1 x10<sup>4</sup>UFC/mL) a 5,91 Log<sub>10</sub>/mL (8,1 x10<sup>5</sup> UFC/mL).

Não há nenhuma lei que padronize ou coloque um limite máximo na contagem total de micro-organismos mesófilos e psicotróficos. Os valores obtidos nas contagens desses micro-organismos foram bastante elevados, de acordo com Champagne (1994), e as contagens de psicotróficos acima de 6,00 log<sub>10</sub> (10<sup>6</sup> UFC/mL) tornam perceptíveis as alterações organolépticas de leite e derivados. Segundo a *Health Protection Agency* (Reino Unido, 2009), a contagem total satisfatória deve ser abaixo de 10<sup>4</sup> UFC/g para produtos cárneos cozidos. Um estudo desenvolvido por Bressan et al. (2007), sobre a contagem de bactérias mesófilas, durante o período de estocagem do presunto cozido fatiado, adotou como limite de qualidade valores máximos de contagem de até 10<sup>3</sup>UFC/g.

Silva et al (2012) analisaram presunto cozido fatiado comercializado em Florianópolis (SC), obtendo contagens entre  $1,6 \times 10^5$  UFC/g a  $2,4 \times 10^7$  UFC/g. Fachinello e Casaril (2013) analisaram presuntos fatiados em Francisco Beltrão (PR), mensurando contagens de mesófilos entre  $2,5 \times 10^1$  UFC/g a  $2,6 \times 10^4$  UFC/g. Menezes, Coelho e Costa (2010) fizeram uma análise em São Luís (MA), também de presunto fatiado, sendo que os valores das contagens de psicotróficos foi entre  $1,0 \times 10^1$  UFC/g até  $4,2 \times 10^8$  UFC/g. Altunatmaz, Issa e Aydin (2012) realizaram um estudo da qualidade microbiológica em alimentos prontos para o consumo comercializados em Edirne (Turquia), e obtiveram valores de contagem de psicotróficos entre  $4,0 \times 10^1$  UFC/m<sup>3</sup> a  $8,2 \times 10^1$  UFC/m<sup>3</sup>

Através dos valores gerados no presente estudo e nos demais, sugere-se a necessidade de atualização da legislação brasileira, criando um limite tolerável e máximo desses micro-organismos em alimentos, uma vez que segundo a *Health Protection Agency* (Reino Unido, 2009), dependendo o tipo de micro-organismo presente, pode ocorrer uma alteração na qualidade organoléptica dos alimentos.

## 5.2 PESQUISA DE *Listeria monocytogenes* EM PRESUNTO COZIDO FATIADO

Das 8 amostras de presunto coletadas, no período de Maio a Junho de 2015, nas 4 bancas do mercado público de Porto Alegre, conseguiu-se isolar 10 colônias de *Listeria* sp. (3 da banca A; 2 da banca B; 2 da banca C e 3 da banca D). Os isolados foram encaminhados para FIOCRUZ para sorotipificação e 5 foram identificadas como *L. monocytogenes*, sendo que 1 foi do sorotipo 1/2a (banca D), 2 do sorotipo 1/2b (banca A e C) e 2 do sorotipo 1/2c (banca B e D). As outras colônias de *Listeria* foram identificadas como *L. innocua* (2 da banca A e 1 da banca D), *L. murray* (banca B) e *L. grayi* (banca C), como mostra a tabela 5.

**Tabela 5.** Espécies e sorotipos de *Listeria* presentes em presunto fatiado

Banca A (3)	Banca B (2)	Banca C (2)	Banca D (3)
<i>L. m.</i> 1/2b (1)	<i>L. m.</i> 1/2c (1)	<i>L. m.</i> 1/2b (1)	<i>L. m.</i> 1/2a (1)
<i>L. innocua</i> (2)	<i>L. murray</i> (1)	<i>L. grayi</i> (1)	<i>L. m.</i> 1/2c (1)
			<i>L. innocua</i> (1)

Legenda: *L. m.*: *Listeria monocytogenes*

Com esses dados foi possível verificar que todos os presuntos analisados mostraram contaminação pelo gênero *Listeria*, obtendo-se 100% da presença desse micro-organismo em presunto cozido fatiado, sendo que 50% (5/10) dos isolados foram identificados como *L. monocytogenes*; 30% (3/10) como *L. innocua*; 10% (1/10) como *L. grayi* e 10% (1/10) como *L. murray*.

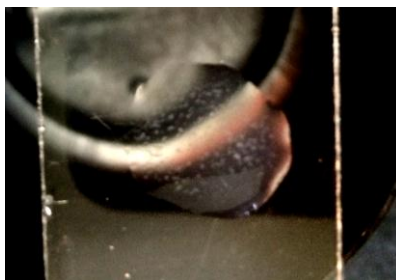
A ocorrência de *L. monocytogenes* nesse estudo, quando comparada com as outras espécies do gênero, convergem com aquilo que Fai et al (2011) detectaram nesse mesmo tipo de alimento em Fortaleza: 42,5% de *L. monocytogenes*, 22,5% de *L. innocua* e 2,5% de *L. welshimeri*. Em outro estudo, direcionado em Niterói/RJ por Araújo et al (2002), pesquisou-se *L. monocytogenes* em *blanquet* e presunto de peru, em duas situações: a peça inteira recebida em sua embalagem original e amostras da mesma peça fatiadas no local de venda. Nas peças inteiras não houve detecção do patógeno (assim como ocorreu no presente estudo), entretanto 60,0% (6/10) foram positivas para *L. monocytogenes* em presunto de peru fatiado e 50,0% (5/10) foram positivas para *L. monocytogenes* em *blanquet* de peru fatiado.

Em contrapartida, Martins (2011) detectou apenas 6,2% de *L. monocytogenes* em salame e 0,8% desse patógeno em presunto cozido fatiado em São Paulo, todavia estes eram todos embalados à vácuo e produzidos por empresas com serviço de inspeção federal, o que sugere um maior rigor no processamento.

Vallim et al (2015) analisaram a ocorrência de *Listeria* spp. em alimentos oriundos de 12 estados brasileiros entre 1990 a 2012, e observaram que 81,7% dos isolados era de origem cárnea, dentre eles 24,3% eram de carnes processadas (cozida, curada ou defumada). Nesse período observou-se que *L. monocytogenes*, tem maior distribuição geográfica nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Paraíba, fato que converge com o presente estudo, o qual foi realizado no estado do Rio Grande do Sul. A distribuição dos sorotipos de *L. monocytogenes* desses mesmos alimentos nesse período no Brasil foi a seguinte: 4b (29,0%); 1/2a (28,2%); 1/2b (20,7%); 1/2c (16,8%); os sorotipos 3a, 3b, 3c, 4c, 4e e cepas não-tipificáveis deram valores inferiores a 1% cada.

### 5.3 PESQUISA DE *Salmonella* spp. EM PRESUNTO COZIDO FATIADO

O gênero *Salmonella* foi pesquisado em amostras de presunto cozido fatiado das 4 bancas do mercado público de Porto Alegre. Quatro colônias características, uma de cada banca, foram isoladas em meio seletivo para *Salmonella* (XLD), e estas foram submetidas a testes bioquímicos de citrato de *Simmons*, TSI, SIM, caldo uréia e LIA. Somente 3 dessas colônias (banca B, C e D) se portaram bioquimicamente como *Salmonella*, as quais foram testadas contra o soro anti-*Salmonella*. Como resultado final, nenhuma das amostras foi positiva para esse gênero, uma vez que nenhuma reagiu com o anti-soro (não houve formação de grumos). Foi utilizada a *Salmonella* sp. ATCC 8327 como controle positivo para essa reação, como demonstra a figura 4.



**Figura 4.** Reação positiva de *Salmonella* sp. ATCC 8327 com o anti-soro polivalente anti-*Salmonella*

Os resultados de pesquisa de *Salmonella* spp. nesse estudo foram negativos, fato similar ocorreu nos presuntos cozidos fatiados analisados por Tonello e Eckert (2013) em Cascavel (PR), por Fachinello e Casaril (2013) em Francisco Beltrão (PR), por Caus et al (2007) em Guarapuava (PR) e por Menezes, Coelho e Costa (2010) em São Luís (MA), os quais diferiram do estudo desenvolvido por Fai et al (2011) que encontrou 34,61% de presença de *Salmonella* sp. em presunto cozido comercializado em Fortaleza (CE). O resultado negativo dessa análise significa que o alimento está dentro do que recomenda a resolução RDC nº 12 de 2 de Janeiro de 2001, a qual exige a ausência desse micro-organismo em 25 g do alimento analisado.



#### 5.4 CONTAGEM E PESQUISA DE MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS, MESÓFILOS E PSICROTRÓFICOS EM PRESUNTO COZIDO INTEIRO.

Foi realizada a análise de uma peça inteira de presunto cozido, em sua embalagem original, da mesma marca das amostras de presunto cozido fatiado. Pesquisou-se *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. e realizou-se as seguintes contagens: de micro-organismos mesófilos, psicrótrófilos, *Staphylococcus* coagulase positiva e de coliformes totais e fecais.

Todas as análises obtiveram resultado negativo, sendo que não houve crescimento de nenhum micro-organismo na menor diluição realizada. Resultou-se como inócua a peça de presunto cozido analisada, sendo assim, a mesma encontra-se dentro dos padrões sanitários exigidos pela Instrução Normativa nº 09, de 08 de abril de 2009, que exige ausência de *L. monocytogenes* em 25 g de alimento analisado e pela RDC nº 12 de 2 de Janeiro de 2001, a qual exige a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de alimento analisado e que a quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva e de coliformes seja inferior a  $10^3$  UFC/g de alimento. Araújo et al (2002), fizeram um estudo similar em Niterói (RJ) aonde pesquisaram *L. monocytogenes* em *blanquet* e presunto de peru, analisando a peça inteira em sua embalagem original e não conseguiram detectar a presença do patógeno.

Provavelmente a inocuidade desse alimento está fortemente relacionada com o Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) adotado pela indústria que produziu o alimento em questão. Além disso, possui certificações BRC (*British Retail Consortium*), IFS (*International Food Standard*), Global-GAP, AloFree e da ISO17025:25 e é auditada por mercados externos, pelo MAPA e pela ANVISA. (BRF, 2016)

#### 5.5 SELEÇÃO E CAPACIDADE ENZIMÁTICA DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS ISOLADAS DE PRESUNTO COZIDO FATIADO

Das placas de contagens de micro-organismos psicrótrófilos de presunto cozido fatiado, selecionaram-se e isolaram-se 134 colônias. Essas colônias selecionadas foram submetidas ao teste de proteólise em ágar leite, e 71 delas apresentaram atividade proteolítica sendo a duplicata de seus os halos de proteólise

mensurados. A média destes pode ser visualizada na tabela 6. Foi utilizado como controle positivo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

**Tabela 6.** Média dos halos de proteólise das bactérias psicrotróficas avaliadas em meio de cultura ágar leite.

Banca A			Banca B			Banca C			Banca D		
Isolado	Média dos Halos	DP	Isolado	Média dos Halos	DP	Isolado	Média dos Halos	DP	Isolado	Média dos Halos	DP
<b>i1</b>	8,12	0,00	<b>i1</b>	4,41	0,26	<b>i1</b>	8,49	0,25	<b>i1</b>	10,62	0,48
<b>i2</b>	8,53	0,59	<b>i2</b>	7,59	0,27	<b>i2</b>	4,06	0,00	<b>i2</b>	2,28	0,00
<b>i3</b>	7,48	0,11	<b>i3</b>	9,30	1,17	<b>i3</b>	8,58	0,23	<b>i3</b>	5,34	0,16
<b>i4</b>	10,96	2,41	<b>i4</b>	8,96	0,00	<b>i4</b>	9,70	0,82	<b>i4</b>	4,30	0,17
<b>i5</b>	4,61	0,31	<b>i5</b>	10,31	0,60	<b>i5</b>	4,39	0,14	<b>i5</b>	6,83	0,08
<b>i6</b>	14,20	1,05	<b>i6</b>	2,80	0,45	<b>i6</b>	9,07	0,37	<b>i6</b>	8,36	0,41
<b>i7</b>	5,61	0,48	<b>i7</b>	3,76	0,26	<b>i7</b>	4,30	0,36	<b>i7</b>	9,32	0,00
<b>i8</b>	7,04	0,67	<b>i8</b>	13,98	0,84	<b>i8</b>	10,89	1,36	<b>i8</b>	4,58	0,12
<b>i9</b>	7,47	0,79	<b>i9</b>	8,07	0,26	<b>i9</b>	4,55	0,72	<b>i9</b>	6,06	0,00
<b>i10</b>	9,19	0,00	<b>i10</b>	8,04	0,68	<b>i10</b>	6,70	0,09	<b>i10</b>	4,41	0,00
<b>i11</b>	9,40	0,00	<b>i11</b>	3,2	0,46	<b>i11</b>	4,20	0,22	<b>i11</b>	10,41	0,26
<b>i12</b>	4,36	0,01	<b>i12</b>	4,66	0,01	<b>i12</b>	4,02	0,96	<b>i12</b>	5,35	0,36
<b>i13</b>	3,82	0,19	<b>i13</b>	3,01	0,07	<b>i13</b>	7,25	0,00	<b>i13</b>	10,80	0,39
			<b>i14</b>	5,95	0,02	<b>i14</b>	14,62	1,62	<b>i14</b>	3,59	0,31
			<b>i15</b>	6,33	0,00	<b>i15</b>	6,83	0,53			
			<b>i16</b>	5,69	0,29	<b>i16</b>	3,61	0,57			
			<b>i17</b>	9,50	0,01	<b>i17</b>	11,18	0,59			
			<b>i18</b>	6,50	1,26	<b>i18</b>	3,77	1,19			
			<b>i19</b>	6,97	0,10	<b>i19</b>	3,09	0,00			
			<b>i20</b>	10,32	0,55	<b>i20</b>	7,14	0,00			
			<b>i21</b>	6,83	0,79						
			<b>i22</b>	4,40	0,50						
			<b>i23</b>	7,17	0,65						
			<b>i24</b>	13,97	0,96	<b>CP</b>		7,32	<b>DP</b>		0,00

Legenda: CP: controle positivo. DP: desvio padrão. Dados expressos em milímetros (mm). i: isolado.

As 71 colônias com atividade proteolítica foram submetidas ao teste de atividade lipolítica em ágar tributirina, e destas 58 demonstraram essa atividade enzimática. A média dos valores da duplicata dos halos lipolíticos estão disponíveis na tabela 7. O controle positivo foi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**Tabela 7.** Média dos halos lipolíticos dos isolados psicotróficos em ágar tributirina

Banca A			Banca B			Banca C			Banca D		
Isolado	Média dos Halos	DP	Isolado	Média dos Halos	DP	Isolado	Média dos Halos	DP	Isolado	Média dos Halos	DP
<b>i2</b>	3,45	0,15	<b>i1</b>	4,85	0,08	<b>i1</b>	2,85	0,19	<b>i2</b>	10,50	0,16
<b>i3</b>	3,95	0,04	<b>i2</b>	3,05	0,02	<b>i2</b>	7,85	1,20	<b>i4</b>	4,20	0,01
<b>i4</b>	3,15	0,07	<b>i3</b>	3,25	0,18	<b>i4</b>	7,05	0,02	<b>i5</b>	2,35	0,06
<b>i7</b>	4,55	0,00	<b>i4</b>	2,80	0,04	<b>i5</b>	1,55	0,12	<b>i6</b>	8,50	0,27
<b>i8</b>	4,75	0,08	<b>i5</b>	3,05	0,09	<b>i6</b>	8,45	0,00	<b>i7</b>	10,75	0,71
<b>i9</b>	3,00	0,05	<b>i6</b>	4,30	0,00	<b>i7</b>	10,60	0,13	<b>i8</b>	4,95	0,07
<b>i11</b>	3,40	0,17	<b>i7</b>	9,80	0,09	<b>i9</b>	7,90	0,00	<b>i9</b>	2,25	0,18
<b>i12</b>	2,85	0,04	<b>i8</b>	3,85	0,07	<b>i10</b>	1,85	0,11	<b>i10</b>	9,75	0,14
<b>i13</b>	5,35	0,09	<b>i9</b>	2,80	0,29	<b>i11</b>	4,20	0,11	<b>i11</b>	5,35	0,00
			<b>i10</b>	5,30	0,00	<b>i13</b>	4,45	0,05	<b>i13</b>	1,80	0,14
			<b>i11</b>	1,85	0,19	<b>i14</b>	3,10	0,09			
			<b>i12</b>	4,00	0,07	<b>i16</b>	6,85	0,08			
			<b>i13</b>	4,25	0,07	<b>i17</b>	3,25	0,00			
			<b>i14</b>	4,75	0,72	<b>i18</b>	8,25	0,03			
			<b>i15</b>	4,35	0,00	<b>i19</b>	2,35	0,02			
			<b>i16</b>	3,05	0,02						
			<b>i17</b>	2,85	0,04						
			<b>i18</b>	4,55	0,08						
			<b>i19</b>	2,10	0,00						
			<b>i20</b>	3,10	0,16						
			<b>i21</b>	2,80	0,12						
			<b>i22</b>	4,25	0,02						
			<b>i23</b>	3,50	0,00						
			<b>i24</b>	3,85	0,18	<b>CP</b>		7,41	<b>DP</b>		0,00

Legenda: CP: controle positivo. DP: desvio padrão. Dados expressos em milímetros (mm). i: isolado.

A quantidade de micro-organismos que foram veiculados no ato de seccionar a peça inteira de presunto, não somente é preocupante em termos de veiculação de patógenos, mas também da quantidade da carga microbiana depositada, sendo que esta pode ser inócua ao ser humano, todavia sua capacidade enzimática pode reduzir drasticamente a qualidade e prazo de validade do produto (vida de prateleira), uma vez que as atividades proteolíticas e lipolíticas estão associadas com a deterioração do produto. Um total de 53% dos isolados psicotróficos demonstraram capacidade proteolítica e 43% atividade lipolítica,

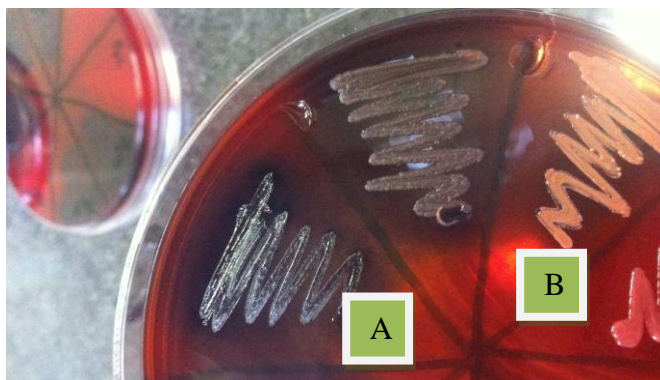
lembrando que os 43% com atividade lipolítica também demonstraram atividade proteolítica.

Ribeiro Júnior, Alcântara e Beloti (2016) pesquisaram o potencial deteriorante de bactérias formadoras de esporos em leite cru brasileiro e observaram que 29,2% (40/137) apresentaram atividade proteolítica e/ou lipolítica. Carpiné et al (2010) fizeram um estudo em salames artesanais aonde buscaram atividade proteolítica e lipolítica de bactérias lácticas presentes nesse alimento, com isso constataram que aproximadamente 85% dos isolados apresentaram atividade proteolítica, porém nenhum apresentou atividade lipolítica. Kenneally, Leushner e Arendt (1998) testaram culturas *starters* utilizadas em fermentação de carnes quanto a atividade lipolítica, sendo que 60,8% demonstraram atividade lipolítica em ágar tributirina.

Papamanoli et al (2003) avaliaram a capacidade proteolítica de bactérias ácido-lática presentes em salsicha fermentada grega e detectaram que todos os isolados de *Lactobacillus plantarum* (7) e de *L. curvatus* (24) apresentaram essa atividade frente a caseína, já nos isolados de *L. sakei*, um total de 73% (36/49) demonstraram atividade proteolítica. Alapont, Martínez-Culebras e López (2014) determinaram a atividade lipolítica e proteolítica da microbiota fúngica presente em presunto curado, verificando que 94,5% apresentaram atividade lipolítica (70/74) e 52,7% (39/74), atividade proteolítica. Esses estudos literários mostram uma variação na porcentagem de micro-organismos com atividade proteolítica e lipolítica, salientando o potencial de deterioração de alguns isolados estudados.

## 5.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS PELAS BACTERIAS PSICROTRÓFICAS ISOLADAS DE PRESUNTO FATIADO

Para a avaliação da produção de exopolissacarídeo (EPS) em ágar vermelho congo (RCA), utilizaram-se os 71 isolados que demonstraram atividade proteolítica. Apenas 12 micro-organismos demonstraram esse tipo de propriedade, através da produção de colônias rugosas e pretas, diferenciando de culturas não produtoras de exopolissacarídeo (as quais se apresentaram como colônias lisas e vermelhas), como demonstra a figura 5. A cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 foi utilizada como controle positivo. Nenhum dos isolados psicotróficos da banca D apresentou a propriedade de produção de exopolissacarídeo.



**Figura 5.** Colônias produtoras de ESP (colônias pretas e metálicas - A) e colônias não produtoras (róseas – B) em meio CRA

Com esse teste, foram observados que somente 4 isolados de microorganismos psicrófilos apresentaram simultaneamente atividade lipoproteínolítica, produção de exopolissacarídeo e capacidade de crescimento a 37°C, como demonstra a tabela 8.

**Tabela 8.** Isolados de bactérias psicrófilas produtoras de exopolissacarídeo em ágar vermelho congo. Testes de produção de enzimas e crescimento a 37°C também foram avaliados.

Isolado	Código Interno	Banca	Proteinase	Lipase	EPS	Crescimento 37°C
i1	P7K	A	+	-	+	-
i5	P3B	A	+	-	+	-
i6	P7J	A	+	-	+	-
i10	P7T	A	+	-	+	-
i7	P4M	B	+	+	+	+
i10	P4E	B	+	-	+	-
i3	P1O	C	+	-	+	-
i8	P5F	C	+	-	+	-
i11	P1B	C	+	+	+	+
i14	P5D	C	+	+	+	+
i15	P5N	C	+	-	+	+
i18	P5H	C	+	+	+	+

Legenda: EPS: exopolissacarídeo. i: isolado. +: positivo. -: negativo.

Kaiser et al (2013) detectaram a produção de biofilme por *S. epidermidis* em ágar vermelho congo; Hassan et al (2011) realizaram a avaliação de diferentes meios, incluindo o CRA, frente a produção de biofilme por isolados de amostras clínicas, utilizando também *S. epidermidis* ATCC 35984 como controle positivo; Mathur et al (2006) conduziram a detecção da formação de biofilme por *Staphylococcus* spp. oriundos de isolados clínicos; Melo et al (2013) detectaram a produção de biofilme por *S. aureus*, em CRA, de isolados causadores de mastite bovina. O trabalho de Mariana et al (2009), que objetivou a detecção da produção de biofilme por *S. aureus* de amostras clínicas, fez uso do *S. epidermidis* ATCC 12228 como controle negativo, sugerindo-o como não produtor de biofilme. Esse teste do CRA é importante, pois através dele pode-se projetar que os isolados produtores de exopolissacarídeo também demonstrem chances de serem produtores de biofilme.

## 5.7 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS SELECIONADAS E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.

### 5.7.1 Identificação Molecular

Para obtenção do sequenciamento de DNA bacteriano, selecionaram-se 2 bactérias (i7 e i14, das bancas B e C, respectivamente) dentre os 4 isolados que apresentaram simultaneamente atividade lipoproteínolítica, produção de exopolissacarídeo e crescimento a 37°C. O serviço de sequenciamento foi realizado pela Ludwig Biotec e através do programa Chromas e do site do Genbank elas foram identificadas molecularmente, com 99% de identidade como *Kluyvera intermedia* NBRC 102594 e com 98% de similaridade com *Carnobacterium maltaromaticum* DSM 20342.

Por ser uma enterobactéria, a presença de *Kluyvera* sp. vem indicar possível contaminação fecal do alimento analisado e pode ser uma bactéria oportunista, a qual venha a causar alguma injúria à saúde. Österblad et al (1999) identificaram esse micro-organismo contaminando vegetais; Farmer et al (1981) isolaram *Kluyvera ascorbata* e *Kluyvera cryocrescens* de amostras clínicas, água, solo e alimentos. Duarte et al (2002) identificaram uma *Kluyvera* sp. oriunda de amostras clínicas hospitalares; Sezer et al (1996) identificaram uma *Kluyvera cryocrescens* de um isolado clínico; Ahmed, Das e Geroge (2015) identificaram em

sêmên de aves 11 bactérias como *Kluyvera ascorbata* e Bastos et al (2008) isolaram uma *Kluyvera* sp. de amostra clínica de origem animal.

Segundo a *Health Protection Agency* (Reino Unido, 2009), a microbiota normalmente encontrada em produtos cárneos é composta por bactérias ácido-láticas, como *Lactobacillus* sp. e *Carnobacterium* sp., os quais não causam danos à saúde do consumidor, porém com quantidades próximas a  $10^9$ UFC/g ocorrerá a deterioração do alimento, devido à produção de ácido lático.

### 5.7.2 Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos

Foi realizada a avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos 2 isolados produtores de exopolissacarídeo identificados e dos 10 isolados de *Listeria* oriundas de presunto fatiado, sendo utilizados os seguintes antimicrobianos: amicacina (AMI), ampicilina (AMP), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), eritromicina (ERI), imipenem (IPM), norfloxacina (NOR), tetraciclina (TET), cefalotina (CFL), cefepima (CPM), gentamicina (GEN), levofloxacina (LVX), meropenem (MER), penicilina (PEN), piperacilina com tazobactam (PPT) e tobramicina (TOB), como mostra a tabela 9. A sensibilidade da bactéria gram-negativa não foi avaliada frente a ERI e PEN uma vez que esses antibióticos têm ação em gram-positivos.

*L. grayi* apresentou resistência à AMI, CPM, PEN e TOB, e intermediária sensibilidade à ERI, GEN e MER, sendo assim, esses 8 antibióticos corresponderam a 41% (7/17) dos antimicrobianos testados. *L. murray* mostrou resistência à AMI, GEN e TOB, e intermediária sensibilidade à ERI, CLF, CPM, e MER, também correspondendo a 41% (7/17) dos antimicrobianos testados. Com isso esses foram os micro-organismos que apresentaram maior capacidade de resistência a múltiplos fármacos, todavia ambos são considerados inócuos ao ser humano. O perfil de resistência destes micro-organismos torna-se preocupante à medida que eles podem vir a transferir plasmídeos de resistência aos antimicrobianos, à outras bactérias patogênicas, como *L. monocytogenes*, todavia seria necessário um estudo detectando a presença desses plasmídeos nos micro-organismos citados.

**Tabela 9.** Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos micro-organismos psicrotróficos isolados de presunto cozido fatiado

Micro-organismo	A	A	C	C	E	I	N	T	C	C	G	L	M	P	P	T
	M	M	I	L	R	P	O	E	F	P	E	V	E	E	P	O
	I	P	P	O	I	M	R	T	L	M	N	X	R	N	T	B
<i>L. grayi</i> (BC)	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	I	S	I	R	S	R
<i>L. innocua</i> (BA)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I	S
<i>L. innocua</i> 2 (BA)	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
<i>L. innocua</i> (BD)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>L. monocytogenes</i> (BA)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>L. monocytogenes</i> (BB)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
<i>L. monocytogenes</i> (BC)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>L. monocytogenes</i> (BD)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>L. monocytogenes</i> 2 (BD)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>L. murray</i> (BB)	R	S	S	S	I	S	S	S	I	I	R	S	I	S	S	R
<i>Carnobacterium</i> sp. (BC)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
<i>Kluyvera</i> sp. (BB)	S	R	S	S	-	S	S	S	R	S	S	S	S	-	S	S

Legenda: R: resistente; S: sensível; I: intermediário. BA: isolado da banca A; BB: isolado da banca B; BC: isolado da banca C; BD: isolado da banca D. AMI: amicacina; AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CLO: cloranfenicol; ERI: eritromicina; IMP: imipenem; NOR: norfloxacina; TET: tetraciclina; CFL: cefalotina; CPM: cefepima; GEN: gentamicina; LVX: levofloxacina; MER: meropenem; PEN: penicilina; PPT: piperacilina com tazobactam; TOB: tobramicina.

Uma grande preocupação que ocorre nos dias atuais é a resistência microbiana frente aos fármacos antimicrobianos, principalmente os de última geração. Pode-se observar alguns casos decorridos na realização do teste de sensibilidade realizado nesse estudo, como se menciona a seguir:

O meropenem é um antimicrobiano do grupo dos carbapenêmicos, que mostra grande resistência contra as betalactamases e grande espectro de ação dentre os beta-lactâmicos. A cefepima é uma cefalosporina de 4ª geração, tendo boa ação contra micro-organismos gram-positivos e gram-negativos (TAVARES, 1993). Todavia 5 bactérias apresentaram resistência à cefepima. O imipenem também é um carbapenêmico, e demonstrou-se eficaz em 100% (12/12) dos micro-organismos testados, já o meropenem mostrou 83% (10/12) de eficácia, dando sensibilidade intermediária em 2 isolados. Outro aspecto interessante observa-se ao comparar esse antimicrobiano beta-lactâmicos (cefepime) com a penicilina, a qual apresentou



apenas 1 micro-organismo resistente. Isso pode ter ocorrido devido ao uso mais frequente de antibióticos de última geração por terem um espectro de ação maior, que conseqüentemente leva a um uso menos frequente de antibióticos de primeira geração, como a penicilina. Todavia para afirmar esse fato deve-se fazer um estudo mais amplo desses fármacos frente à resistência microbiana.

Nyenje et al (2012) realizaram o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *L. ivanovii* isolada de vários alimentos prontos para consumo na cidade de Alice (África do Sul), utilizando ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), eritromicina (ERI), penicilina (PEN). Todos os isolados de *L. ivanovii* foram resistentes a PEN e ERI, divergindo das espécies de *Listeria* sp. encontradas nesse estudo, que se mostraram sensíveis a esses antimicrobianos, com exceção de *L. grayi* que mostrou resistência a PEN. O estudo de Nyenje et al (2012) também mostrou que todos os isolados de *L. ivanovii* foram sensíveis ao CLO e CIP, convergindo com o presente estudo.

Ieren, Bello e Kwaga (2013) testaram CIP, CLO, AMP, ERI, PEN, TET e GEN contra *L. monocytogenes* e *Listeria* sp. isoladas de saladas e legumes vendidos em Zaria (Nigéria) e observaram que 92,9% dos isolados mostraram resistência a AMP; 78,5% resistência a PEN; 71,4 resistência a TET; 42,8% de resistência ao CLO; 64,2% resistência a ERI; 21,4% resistência a GEN e 14,3% resistência a CIP. Já no presente estudo observa-se que todos os isolados (100%) do gênero *Listeria* sp. foram sensíveis a AMP; 90% sensíveis a PEN; 100% sensíveis a TET; 100% sensíveis a CLO; 80% sensíveis a ERI; 80% sensíveis a GEN e 90% sensíveis a CIP.

Issa et al (2011) realizou o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos frente a isolados de *Listeria monocytogenes* oriundos de alimentos vendidos em Selangor (Malásia). Para o teste utilizou AMP, CLO, ERI, PEN e TET, obtendo 100% de resistência a AMP; 100% de resistência a PEN; 86,9% de resistência a TET; 52,1% de sensibilidade ao CLO e 56,5% de sensibilidade a ERI, divergindo do encontrado no presente estudo.

Wong et al (2012) testaram isolados de *L. monocytogenes* obtidos de hambúrgueres empanados comercializados na Malásia frente a AMP, PEN, IPM, GEN, TET, ERI e CLO, obtendo 95,1% de sensibilidade a AMP; 97,6% de sensibilidade a PEN; 100% de sensibilidade ao IPM; 100% de sensibilidade a GEN;

53,7% de sensibilidade a TET; 63,4% de sensibilidade a ERI e 92,7% de sensibilidade ao CLO, convergindo com os dados do presente estudo.

O trabalho de Ligimol et al (2016) testa isolados de *Lactobacillus* sp. oriundos de alimentos e fezes de gansos mantidos na coleção de cultura do *College of Dairy Science and Technology* (Índia) frente a AMP, CLO, CIP, GEN e TET. Obtiveram-se 100% de resistência a AMP; 100% de sensibilidade ao CLO; 50% de sensibilidade a CIP; 100% de sensibilidade a GEN e 100% de sensibilidade a TET. No presente estudo obtiveram-se 100% de sensibilidade desse gênero a AMP, CLO, CIP, GEN e TET. O isolado de *Carnobacterium* sp. do presente estudo mostrou sensibilidade a GEN, TET, CLO, PEN e AMP. Uma vez que *Carnobacterium* sp. é um lactobacilo, não causa injúrias ao ser humano e ainda possuem atividade antimicrobiana frente a muitos patógenos, não é comumente realizado o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos desse gênero, mas sim utilizar sua capacidade antimicrobiana frente a outros micro-organismos, com isso não há muita informação a respeito de perfil antimicrobiano do gênero na literatura.

*Kluyvera* sp. apresentou resistência à AMP, ERI, IMP e CFL. Farmer et al (1981) fez o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos frente a *Kluyvera ascorbata* e *Kluyvera cryocrescens* isoladas de amostras clínicas, água, solo e alimentos. Testou esses micro-organismos contra GEN, TET, CLO, PEN e AMP, obtendo 100% de sensibilidade a GEN para ambas; 100% de sensibilidade a TET para *K. cryocrescens* e 85% de sensibilidade para *K. ascorbata*; 97% de sensibilidade ao CLO para *K. ascorbata* e 94% de sensibilidade para *K. cryocrescens*; 100% de resistência a PEN para ambas e 93% de resistência a AMP para *K. ascorbata* e 75% de resistência para *K. cryocrescens*. Sezer et al (1996) identificou uma *Kluyvera cryocrescens* de um isolado clínico que se mostrou resistente a AMP, sensível ao IPM, GEN, TOB e CIP, praticamente igual ao atual estudo. Ahmed, Das e Geroge (2015) identificaram em sêmen de aves 11 bactérias como *Kluyvera ascorbata* e testaram elas frente a NOR, CIP e GEN, obtendo 100% de sensibilidade a NOR; 100% de sensibilidade a CIP e 63,6% de sensibilidade a GEN. Bastos et al (2008) isolou uma *Kluyvera* sp. de amostra clínica animal e esta foi sensível a AMP, CLO, GEN, TET e TOB. No presente estudo *Kluyvera* sp. mostrou sensibilidade a NOR, CIP e GEN e também a CLO, TET e TOB.

## 5.8 FORMAÇÃO DE BIOFILME PELAS BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS SELECIONADAS

Dentre as 4 bactérias que apresentaram simultaneamente atividade lipoproteínolítica, produção de LPS e crescimento a 37°C, selecionaram-se 2 destas (*Kluyvera* sp. e *Carnobacterium* sp.) e mais 2 isolados *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes* 1/2b (banca A) e *L. monocytogenes* 1/2c (banca B)) oriundos de presunto cozido fatiado para verificação da capacidade de produção de biofilme em placas de 96 poços, em octoplicata. Foi utilizado *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 como controle positivo, pois é forte produtor de biofilme.

As bactérias selecionadas (*Kluyvera* sp. (banca B), *Carnobacterium* sp. (banca C), *L. monocytogenes* 1/2b (banca A) e *L. monocytogenes* 1/2c (banca B)) para esse teste, apresentaram fraca formação de biofilme, tanto em presença como em ausência de glicose, como demonstra a tabela 10.

**Tabela 10.** Média da densidade óptica da produção de biofilme pelos isolados selecionados com e sem adição de 1% de glicose

Amostra	Média (Glicose)	Desvio Padrão	Média (Sem Glicose)	Desvio Padrão	Resultado
<b>Controle Positivo</b>	0,318	0,011	0,355	0,023	Forte
<b><i>Kluyvera</i> sp.</b>	0,074	0,005	0,082	0,003	Fraco
<b><i>Carnobacterium</i> sp.</b>	0,047	0,001	0,051	0,003	Fraco
<b><i>K. sp.</i> + <i>C. sp.</i></b>	0,088	0,005	0,081	0,005	Fraco
<b><i>L. monocytogenes</i> 1/2b</b>	0,066	0,006	0,064	0,006	Fraco
<b><i>L. monocytogenes</i> 1/2c</b>	0,066	0,002	0,072	0,017	Fraco

Legenda: CP: controle positivo; K. sp.: *Kluyvera* sp.; C. sp.: *Carnobacterium* sp.; L. m.: *Listeria monocytogenes*

Rodrigues et al (2010) realizaram o mesmo método para quantificação de biofilme produzido por *Listeria* sp. isoladas de abatedouro de aves, obtiveram 4 isolados não produtores de biofilme, 1 fraco produtor e 2 moderados produtores na presença de 0,5% de glicose. Já com a adição de 1% de glicose, obtiveram 1 isolado não produtor, 5 fracos produtores e 1 moderado produtor; e sem adição de glicose obtiveram 1 isolado não produtor, 3 fracos produtores e 3 moderados produtores de biofilme. Stepanovic et al (2004) realizaram essa técnica e obtiveram 5 isolados de *L. monocytogenes* como fortes formadores de biofilme, 1 como

moderado formador e 1 como fraco formador, em meio TSB. Barbosa et al (2009) determinaram a capacidade de 258 *Listeria monocytogenes* isoladas de alimentos em produzir biofilme, obtendo 2 isolados não formadores, 177 fracos formadores e 79 como moderados formadores de biofilme. Doijad et al (2015) determinaram a quantificação de biofilmes produzidos por *L. monocytogenes*, obtendo 63,25% de isolados fraco formadores, 27,55% de moderados formadores e 9 fortes formadores de biofilme. Barbosa et al (2013) analisaram a produção de biofilme de *L. monocytogenes* oriunda de alimentos e amostras clínicas, obtendo 54% de fracos formadores, aproximadamente 40% de moderados formadores, menos de 5% de fortes formadores de biofilme a 37°C de origem alimentar e 70% de fracos formadores, aproximadamente 25% de moderados e menos de 5% de fortes de origem clínica, a 37°C.

Sendo assim, no presente estudo, a adição ou não de glicose não alterou a classificação de *Listeria monocytogenes* frente à produção de biofilme, mantendo-as como fracas produtoras em ambos os casos. Esse resultado já é preocupante, uma vez que o biofilme promove uma maior proteção à vida bacteriana, dificultando a sua eliminação da linha industrial.

Até o presente momento não foram encontrados dados literários utilizando essa técnica para quantificação de biofilme para *Kluyvera* sp. e *Carnobacterium* sp.

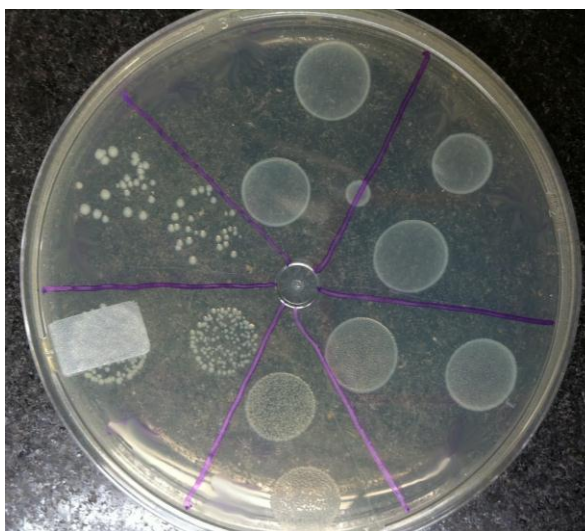
## 5.9 AVALIAÇÃO DA ADESÃO DOS ISOLADOS PSICROTRÓFICOS EM CORPOS DE AÇO INOXIDÁVEL

Dentre as 4 bactérias que apresentaram simultaneamente atividade lipoproteínolítica, produção de exopolissacarídeo e crescimento a 37°C, selecionaram-se 2 destas (*Kluyvera* sp. (banca B) e *Carnobacterium* sp. (banca C) e mais 2 isolados *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes* 1/2b (banca A) e *L. monocytogenes* 1/2c (banca B)) oriundos de presunto cozido fatiado para verificação da capacidade de aderência em corpos de prova de aço inoxidável.

Realizaram-se as contagens das células planctônicas livres (não aderentes) encontradas no meio de cultura, e também das células que estavam aderidas no inox, como demonstra a tabela 11 e figura 6. O experimento foi

realizado em duplicata e o controle positivo foi o *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984.

Os resultados mostram que os micro-organismos testados tem capacidade de adesão em aço inoxidável.



**Figura 6.** Contagem de colônias planctônicas em meio PCA

**Tabela 11.** Valores das contagens de bactérias planctônicas e de bactérias aderidas em aço inoxidável

	<b>Células Planctônicas</b>	<b>Aderência em Inox</b>
<i>L. monocytogenes</i> 1/2b	8,290 <sup>a</sup>	4,171 <sup>b</sup>
<i>L. monocytogenes</i> 1/2c	8,000 <sup>a</sup>	4,406 <sup>b</sup>
<i>Kluyvera</i> sp.	8,505 <sup>a</sup>	5,267 <sup>c</sup>
<i>Carnobacterium</i> sp.	8,469 <sup>a</sup>	4,447 <sup>b</sup>
Controle Positivo	8,278 <sup>a</sup>	4,389 <sup>b</sup>

Legenda: Dados expressos em Log<sub>10</sub>/ cm<sup>2</sup>. Letras diferentes significa que há diferença estatística nos valores para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (p<0,05).

Todos os micro-organismos submetidos ao teste tiveram o mesmo resultado estatístico nos valores de células planctônicas, de acordo com o teste de Tukey. O mesmo ocorreu com as células aderidas em aço inoxidável, com exceção da *Kluyvera* sp., que obteve valores maiores que as demais em termos de aderência em inox.

Tanto a capacidade de produção de biofilme quanto a aderência em aço inoxidável são fatores preocupantes na indústria de alimentos, uma vez que esse tipo de material é comumente usado em larga escala. A associação de aderência com a produção de biofilme acaba dificultando a remoção e/ou eliminação de micro-organismos no setor industrial, uma vez que o biofilme confere maior proteção aos micro-organismos que se encontram aderidos e formando o biofilme (DAVIES, 2003; CIOFU et al, 2015).

Bae et al (2012) determinaram a capacidade de adesão de *L. monocytogenes* em superfícies de aço inoxidável e obtiveram, a 25 °C, um total de 3 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> células aderidas em corpos de aço inoxidável. Casarin et al (2014) também demonstraram a capacidade de aderência de *L. monocytogenes* em aço inoxidável, obtendo valores próximos a 3 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>. No presente estudo ambas as culturas de *Listeria monocytogenes* ficaram próximas a 4 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>. Stepanovic et al (2004) avaliaram a aderência desse patógeno em superfícies plásticas, sendo que o número de células aderidas variou entre 2 a 3 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>. Níveis similares de aderência por esse micro-organismo foram observados em superfícies de vidro, no estudo de Chae e Schraft (2000). O estudo realizado por Oliveira et al (2010), mostra que um total de 4,89 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> de células de *L. monocytogenes* foram capazes de se aderirem em aço inoxidável após 3 horas de contato, e 4,08 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> após 48 horas, esses valores mostram maior proximidade com os encontrados no presente estudo, vindo a convergirem. A quantidade de células planctônicas no trabalho de Oliveira et al (2010), mostrou valores de 8,97 Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup> após 3 horas e de 8,85 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> após 48 horas, lembrando que o valor do inóculo adicionado para o experimento foi de 8 Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>, os valores de células planctônicas também mostraram convergência com o presente estudo.

Até o presente momento não foram encontrados dados literários utilizando essa técnica para capacidade de aderência em aço inoxidável para *Kluyvera* sp. e *Carnobacterium* sp.

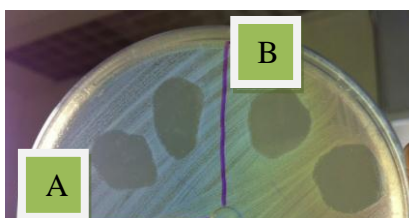
## 5.10 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS, MESÓFILAS E PATOGÊNICAS EM PRESUNTO COZIDO FATIADO, TRATADOS COM PEDIOCINA E EXTRATO DE HIBISCO

Antes de dar sequência ao tratamento do presunto cozido fatiado, com o objetivo da redução da carga microbiana presente nesse alimento através do uso de pediocina e extrato de hibisco, foi realizada a concentração efetiva desses compostos frente certos micro-organismos, para obtenção de uma concentração mínima para tratar o alimento.

### 5.10.1 Avaliação da Concentração Inibitória de Pediocina e Extrato de Hibisco

Com o objetivo de incorporar pediocina ALTA™2345 (Kerry®) e extrato de hibisco (ABC Pharmus manipulação) no presunto cozido fatiado realizou-se um teste para obter qual concentração dos compostos seria efetiva contra micro-organismos durante o tratamento do alimento.

Foram utilizadas como bactérias indicadoras para o teste da pediocina: *Carnobacterium* sp. (banca C), *Kluyvera* sp. (banca B), *L. monocytogenes* 1/2b (banca A), *L. monocytogenes* 1/2c (banca B) e *L. monocytogenes* ATCC 7644, esta última sendo usada como controle positivo, uma vez que pediocina tem efeito antilisteria. Foi utilizada a técnica de difusão em ágar do CLSI (2013), modificada, onde se semeou o micro-organismo em ágar Mueller Hinton (Himedia ®) numa concentração de 0,5 da escala de McFarland e após isso 20 µL de pediocina ALTA™2345 (Kerry®) 0,5% e 1,0% (concentração máxima permitida para testes em produtos cárneos) foram distribuídas em forma de gotas. Levou-se por 24 horas a 37°C para incubação. Após foi possível visualizar e mensurar halos translúcidos nas gotas de pediocina adicionadas na superfície da placa, como demonstra a figura 7.



**Figura 7.** Mensuração dos halos translúcidos por adição de pediocina 0,5% (A) e de pediocina 1,0% (B).

A tabela 12 mostra a média da sextuplicata dos halos translúcidos formados entorno das gotas de pediocina 0,5% e 1,0% em ágar Mueller Hinton.

**Tabela 12.** Médias dos halos translúcidos após a adição de pediocina 0,5% e 1,0% em ágar Mueller Hinton.

	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>L. m.</i> 1/2b	<i>L. m.</i> 1/2c	<i>L. m.</i> ATCC 7644	<i>Kluyvera</i> sp.
Pediocina 0,5%	11,8	15,5	10,6	14,6	0
Pediocina 1,0%	14,6	19,3	13,0	16,1	0

Legenda: Dados expressos em milímetro (mm). *L. m.*: *Listeria monocytogenes*.

As bactérias indicadoras escolhidas para o teste de concentração necessária efetiva de extrato de hibisco foram: *Kluyvera* sp., *Carnobacterium* sp., *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 10536. Foi utilizada a técnica de disco difusão do CLSI (2013), modificada, onde se semeou o micro-organismo em ágar Mueller Hinton (Himedia ®) numa concentração de 0,5 da escala de Mc Farland e após isso 20 µL de extrato de hibisco (ABC Pharmus manipulação) em concentrações de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 % foram distribuídas em forma de gotas nesse meio. Levou-se por 24 horas a 37°C para incubação. Após foi possível visualizar e mensurar halos translúcidos após a adição da gota de extrato de hibisco, havendo crescimento microbiano somente envolta dele. A tabela 13 mostra a média da triplicata dos halos translúcidos formados nas diferentes concentrações de extrato de hibisco em ágar Mueller Hinton.

**Tabela 13.** Médias dos halos translúcidos formados nas diferentes concentrações de extrato de hibisco em ágar Mueller Hinton.

Indicadora	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
<i>E. coli</i> 10536	0	0	0	0	0	8,0	10	10
<i>L. m.</i> 7644	0	11	12	12	13	11	12	12
<i>Kluyvera</i> sp.	0	12	12	11	12	12	13	12
<i>C. sp.</i>	0	12	12	12	13	13	12	13

Legenda: Dados expressos em milímetro (mm); *L. m.*: *Listeria monocytogenes*; *C. sp.*: *Carnobacterium* sp.



Com os resultados gerados, foram escolhidas para aplicação em presunto fatiado como tratamento as 2 concentrações de pediocina (0,5% e 1,0%) e a concentração de 40% do extrato de hibisco, uma vez que foi a menor concentração testada que mostrou eficácia frente a todos os micro-organismos testados, exceto para *E. coli*.

#### 5.10.2 Resultados do Comportamento de Micro-organismos Psicotróficos, Mesófilos e Patogênicos em Presunto Cozido Fatiado frente ao Tratamento com Pediocina e Extrato de Hibisco

Aproximadamente 250 g de presunto cozido fatiado foram empregados para avaliação de cada tipo de tratamento. Após a adição de pediocina e extrato de hibisco ao presunto, foram feitas contagens de *Listeria* spp. (em ágar ALOA, incubadas por 48 horas a 30°C), de *E. coli* (em ágar EMB, incubadas por 48 horas a 37°C), de *S. aureus* (em ágar Baird-Parker, incubadas por 48 horas a 37°C), de micro-organismos mesófilos (em ágar PCA, incubadas por 48 horas a 37°C) e de micro-organismos psicotróficos (em ágar PCA, incubadas por 10 dias em temperatura de refrigeração 4 - 8°C) para a determinação de unidades formadoras de colônias de cada tipo dessas bactérias. As contagens dos experimentos foram feitas em quintuplicata (psicotróficos e mesófilos) e em duplicata (contagem de *Listeria* spp., *E. coli* e *S. aureus*), sendo realizadas nos dias 0 (antes do tratamento), 2, 5 e 12 dias. As amostras ficaram sempre mantidas sempre em refrigeração (4 - 8°C).

Os dados foram submetidos ao teste de Tukey, para avaliar as diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos de tratamentos, com o auxílio do programa SPSS versão 18.0.3.

##### 5.10.2.1 Presunto Cozido Fatiado Submerso Continuamente ao Tratamento com Pediocina e Extrato de Hibisco

Nesse experimento, o presunto fatiado permaneceu submerso em tempo integral nos tratamentos, sendo eles divididos em: grupo controle (C), grupo tratado com pediocina 0,5% (P) e grupo tratado com extrato de hibisco a 40% (H).

Através de análise estatística pode-se afirmar que o dia 0 de todos os tratamentos foram iguais, em todas as contagens realizadas, isso significa que todos

continham a mesma carga microbiana antes da submissão desse alimento aos tratamentos realizados.

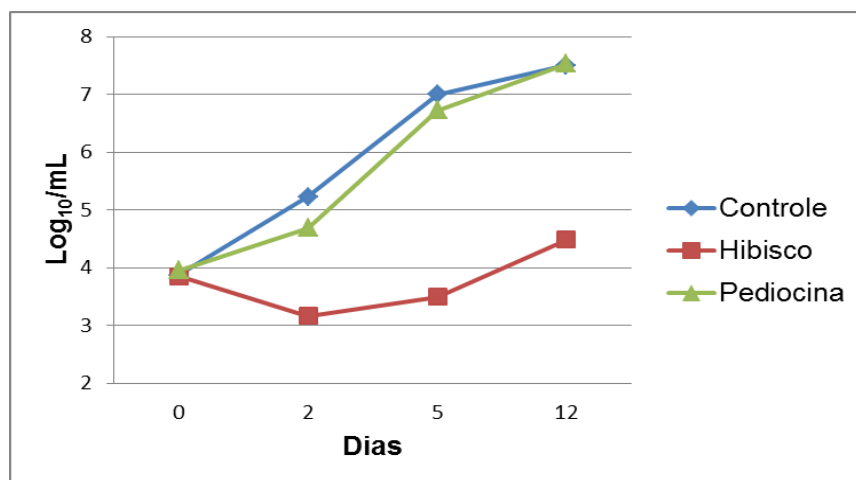
#### 5.10.2.1.1 Contagem de Mesófilos

Pediocina 0,5% foi eficaz nas análises dos dias 2 e 5, sendo que reduziu  $0,53 \log_{10}$  no dia 2 e  $0,28 \log_{10}$  no dia 5. Entretanto o tratamento com hibisco mostrou-se mais eficiente em termos de redução de carga microbiana, ou seja, o hibisco somente no dia 12 apresentou a carga microbiana que a pediocina já apresentou no dia 2, mostrando assim maior controle. O tratamento com hibisco reduziu  $2,06 \log_{10}$  no dia 2,  $3,5 \log_{10}$  no dia 5 e  $3,02 \log_{10}$  no dia 12. Sendo assim pediocina teve ação contra mesófilos nos dias 2 e 5 e o extrato de hibisco nos dias 2, 5 e 12. Os valores podem ser visualizados na tabela 14 e no gráfico 1.

**Tabela 14.** Contagem de micro-organismos mesófilos durante o tratamento contínuo com pediocina 0,5% e extrato de hibisco 40% do presunto cozido fatiado e avaliação da similaridade estatística entre eles

	C0	C2	C5	C12	H0	H2	H5	H12	P0	P2	P5	P12
Mesó- filos	3,86 A	5,23 D	7,00 E	7,50 B	3,85 A	3,17 F	3,50 G	4,48 C	3,39 A	4,70 C	6,72 H	7,53 B

Legenda: C0: controle dia 0; C2: controle dia 2; C5: controle dia 5; C12: controle dia 12; H0: hibisco dia 0; H2: hibisco dia 2; H5: hibisco dia 5; H12: hibisco dia 12; P0: pediocina dia 0; P2: pediocina dia 2; P5: pediocina dia 5; P12: pediocina dia 12. Dados expressos em  $\text{Log}_{10}/\text{mL}$ . Letras diferentes significa que há diferença estatística nos valores para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 1.** Contagem de micro-organismos mesófilos durante o tratamento contínuo com pediocina 0,5% e extrato de hibisco 40% do presunto cozido fatiado

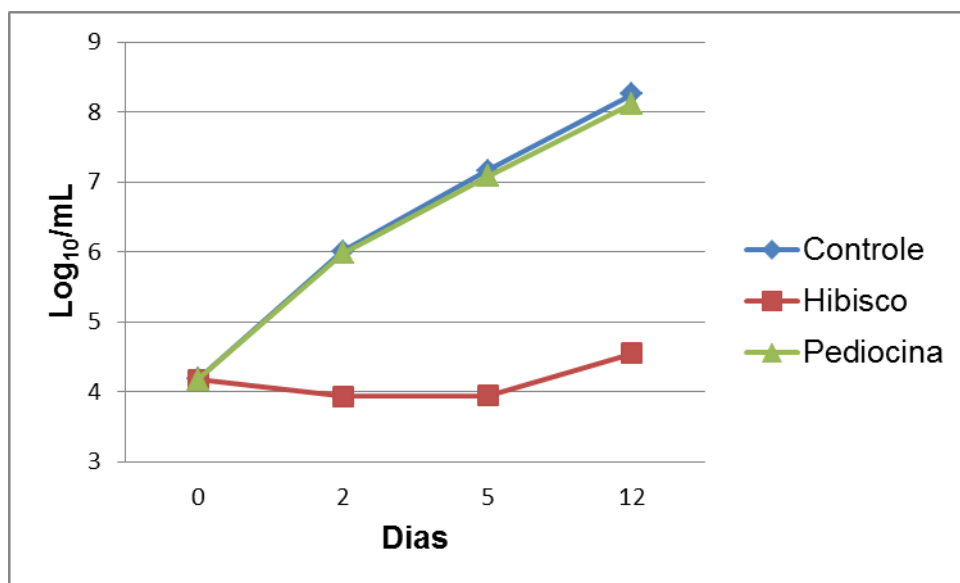
### 5.10.2.1.2 Contagem de Psicotróficos

Pediocina 0,5% foi estatisticamente igual ao grupo controle, ou seja, não demonstrou nenhuma eficiência. No tratamento com hibisco, os dias 2 e 5 foram estatisticamente iguais, sugerindo um controle da carga microbiana nesse período. Ao se comparar o grupo controle com o hibisco, nota-se uma redução de 2,08  $\log_{10}$  no dia 2, 3,22  $\log_{10}$  no dia 5 e 3,71  $\log_{10}$  no dia 12, tendo comportamento similar frente aos mesófilos. Com isso, pediocina não demonstrou nenhum efeito frente a psicotróficos, todavia o extrato de hibisco o fez nos dias 2, 5 e 12. Os valores podem ser visualizados na tabela 15 e no gráfico 2.

**Tabela 15.** Contagem de micro-organismos psicotróficos durante o tratamento contínuo com pediocina 0,5% e extrato de hibisco 40% do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles

	C0	C2	C5	C12	H0	H2	H5	H12	P0	P2	P5	P12
Psicro	4,20	6,01	7,16	8,26	4,17	3,93	3,94	4,55	4,17	5,00	7,07	8,11
tróficos	A	B	C	D	A	E	E	F	A	B	C	D

Legenda: C0: controle dia 0; C2: controle dia 2; C5: controle dia 5; C12: controle dia 12; H0: hibisco dia 0; H2: hibisco dia 2; H5: hibisco dia 5; H12: hibisco dia 12; P0: pediocina dia 0; P2: pediocina dia 2; P5: pediocina dia 5; P12: pediocina dia 12. Dados expressos em  $\text{Log}_{10}/\text{mL}$ . Letras diferentes significa que há diferença estatística nos valores para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 2.** Contagem de micro-organismos psicotróficos durante o tratamento contínuo com pediocina 0,5% e extrato de hibisco 40% do presunto cozido fatiado

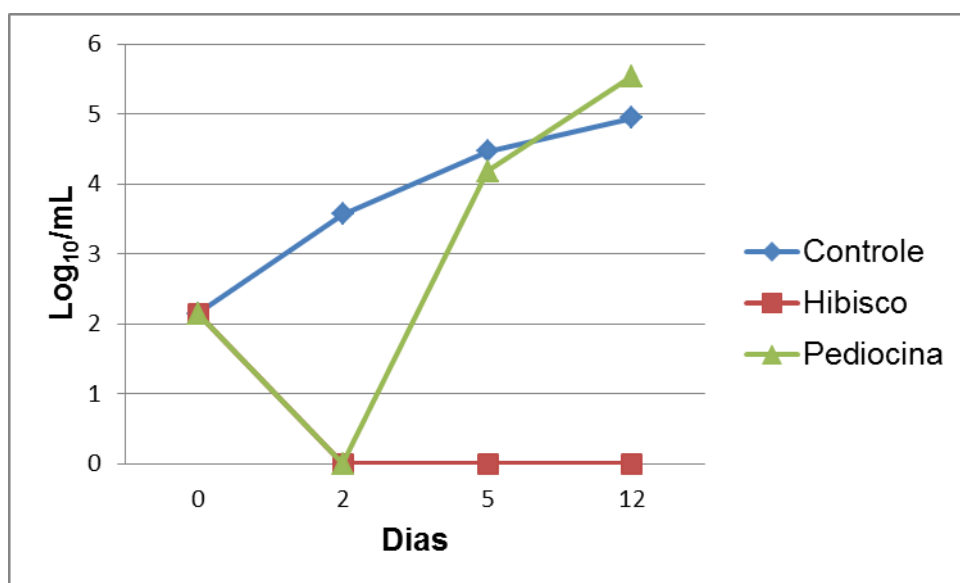
### 5.10.2.1.3 Contagem de *Listeria* spp.

O tratamento com hibisco mostrou grande eficiência contra esse patógeno, observando-se ausência de crescimento, quando as contagens foram realizadas nos dias 2, 5 e 12. A pediocina 0,5% mostrou efeito exclusivamente no dia 2 (redução de 3,56  $\log_{10}$ ), no dia 5 já foi estatisticamente igual ao controle, ou seja, ineficiente. O hibisco mostrou redução de 3,56  $\log_{10}$  no dia 2, 4,46  $\log_{10}$  no dia 5 e 4,95  $\log_{10}$  no dia 12. Com isso pode-se afirmar que o extrato de hibisco teve boa atuação frente a esses micro-organismos nos dias 2, 5 e 12, já a pediocina mostrou efeito somente no dia 2, sugerindo uma ação curta desse último composto. Os valores podem ser visualizados na tabela 16 e no gráfico 3.

**Tabela 16.** Contagem de *Listeria* spp. durante o tratamento contínuo com pediocina 0,5% e extrato de hibisco 40% do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles

	C0	C2	C5	C12	H0	H2	H5	H12	P0	P2	P5	P12
<i>Listeria</i> spp.	2,15	3,56	4,46	4,95	2,15	0	0	0	2,15	0	4,18	5,53
	A	D	B	E	A	C	C	C	A	C	B	F

Legenda: C0: controle dia 0; C2: controle dia 2; C5: controle dia 5; C12: controle dia 12; H0: hibisco dia 0; H2: hibisco dia 2; H5: hibisco dia 5; H12: hibisco dia 12; P0: pediocina dia 0; P2: pediocina dia 2; P5: pediocina dia 5; P12: pediocina dia 12. Dados expressos em  $\log_{10}/\text{mL}$ . Letras diferentes significa que há diferença estatística nos valores para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 3.** Contagem de *Listeria* spp. durante o tratamento contínuo com pediocina 0,5% e extrato de hibisco 40% do presunto cozido fatiado

#### 5.10.2.1.4 Contagem de *E. coli*

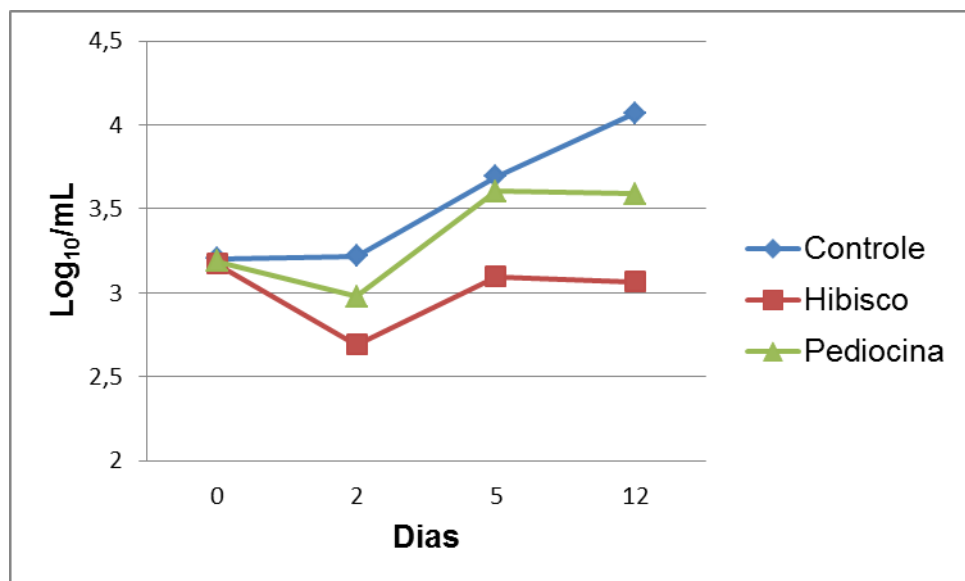
As contagens de todos os tratamentos no dia 0 não diferiram estatisticamente do hibisco nos dias 2, 5 e 12, nem da pediocina 0,5% no dia 2, isso mostra que o hibisco foi eficiente no controle da multiplicação microbiana desse micro-organismo durante os dias analisados, tendo um efeito bacteriostático sobre a divisão bacteriana e a pediocina teve essa capacidade exclusivamente no dia 2.

O hibisco reduziu cerca de 0,51  $\log_{10}$  no dia 2, 0,60  $\log_{10}$  no dia 5 e 1,01  $\log_{10}$  no dia 12, e a pediocina 0,5% reduziu 0,24  $\log_{10}$  no dia 2. Os valores podem ser visualizados na tabela 17 e no gráfico 4.

**Tabela 17.** Contagem de *E. coli* durante o tratamento contínuo com pediocina 0,5% e extrato de hibisco 40% do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles

	C0	C2	C5	C12	H0	H2	H5	H12	P0	P2	P5	P12
<i>E. coli</i>	3,20	3,21	3,69	4,07	3,17	2,70	3,09	3,06	3,18	2,97	3,60	3,59
	A	A	B	D	A	C	A	A	A	AC	B	B

Legenda: C0: controle dia 0; C2: controle dia 2; C5: controle dia 5; C12: controle dia 12; H0: hibisco dia 0; H2: hibisco dia 2; H5: hibisco dia 5; H12: hibisco dia 12; P0: pediocina dia 0; P2: pediocina dia 2; P5: pediocina dia 5; P12: pediocina dia 12. Dados expressos em  $\log_{10}/\text{mL}$ . Letras diferentes significa que há diferença estatística nos valores para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 4.** Contagem de *E. coli* durante o tratamento contínuo com pediocina 0,5% e extrato de hibisco 40% do presunto cozido fatiado

#### 5.10.2.1.5 Contagem de *S. aureus*

Nenhuma colônia característica cresceu em meio Baird-Parker, em nenhum dos dias analisados.

#### 5.10.2.2 Presunto Submerso por 1 hora e 40 minutos no Tratamento

Nesse experimento, o presunto fatiado permaneceu submerso durante o tempo de 1 hora e 40 minutos nos tratamentos, sendo eles: grupo controle (C), grupo tratado com pediocina 0,5% (P0,5%), grupo tratado com pediocina 1,0% (P1,0%) e grupo tratado com extrato de hibisco a 40% (H). Através de análise estatística pode-se afirmar que o dia 0 de todos os tratamentos não diferiu uns dos outros, em todas as contagens realizadas.

##### 5.10.2.2.1 Contagem de Mesófilos

Não houve diferença estatística entre o grupo controle e pediocina 0,5%, isso quer dizer que ela foi ineficiente no controle de mesófilos. A pediocina 1% e a pediocina 0,5% demonstraram o mesmo efeito no dia 2. A carga microbiana foi constante entre os dias 5 e 12 da pediocina 1%, sugerindo um controle da multiplicação microbiana, todavia no dia 5 ela aumentou 0,81 Log<sub>10</sub>, sendo ineficaz.

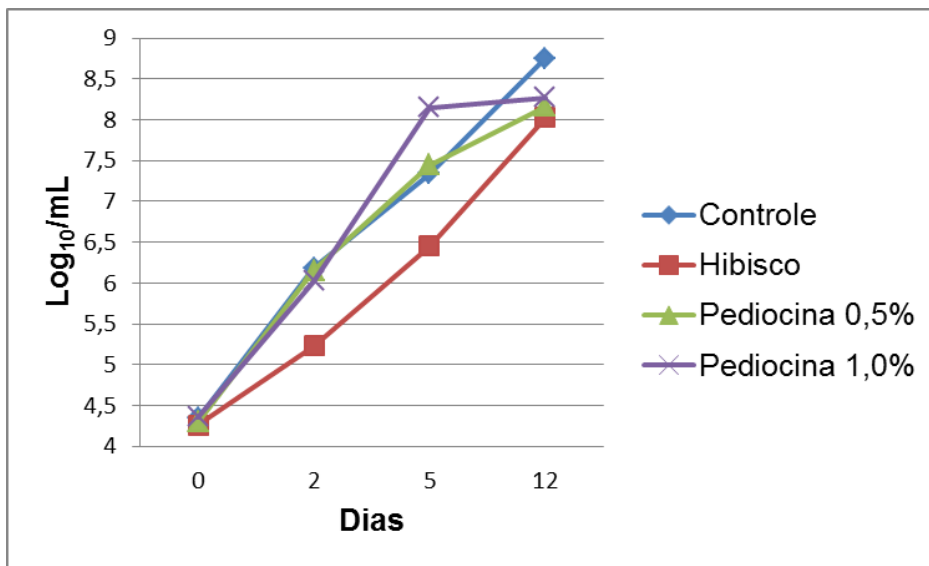
Hibisco reduziu 0,96 log<sub>10</sub> no dia 2, 0,89 log<sub>10</sub> no dia 5 e 0,73 log<sub>10</sub> no dia 12. Os valores podem ser visualizados na tabela 18 e no gráfico 5.

**Tabela 18.** Contagem de mesófilos durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles

	C0	C2	C5	C12	H0	H2	H5	H12
	4,37	6,19	7,34	8,75	4,26	5,23	6,45	8,02
	A	B	C	F	A	G	H	E
Mesófilos	P1%	P1%	P1%	P1%	P0,5%	P0,5%	P0,5%	P0,5%
	0	2	5	12	0	2	5	12
	4,35	6,02	8,15	8,26	4,30	6,15	7,44	8,16
	A	D	E	E	A	BD	C	E

Legenda: C0: controle dia 0; C2: controle dia 2; C5: controle dia 5; C12: controle dia 12; H0: hibisco dia 0; H2: hibisco dia 2; H5: hibisco dia 5; H12: hibisco dia 12; P1% 0: pediocina 1% dia 0; P1% 2: pediocina 1% dia 2; P1% 5: pediocina 1% dia 5; P1% 12: pediocina 1% dia 12; P0,5 0: pediocina 0,5% dia 0; P0,5 2: pediocina 0,5% dia 2; P0,5 5: pediocina 0,5% dia 5; P0,5 12: pediocina 0,5% dia 12. Dados expressos em Log<sub>10</sub>/mL. Letras

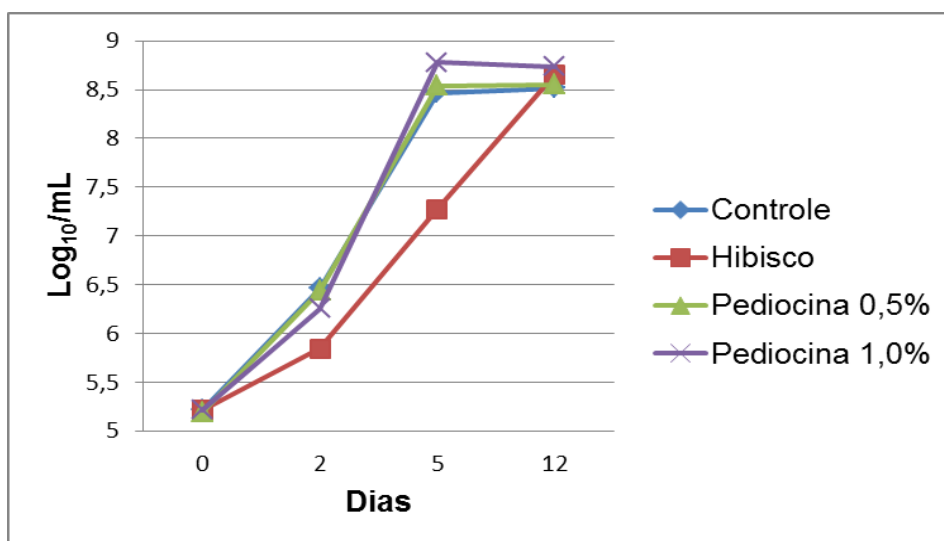
diferentes significa que há diferença estatística nos valores para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 5.** Contagem de mesófilos durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco do presunto cozido fatiado

#### 5.10.2.2.2 Contagem de Psicotróficos

Pediocina 0,5% mostrou-se ineficaz. A carga microbiana foi constante entre os dias 5 e 12 da pediocina 1%, porém as contagens deram superiores ao grupo controle. O hibisco provocou uma redução de  $0,61 \log_{10}$  no dia 2 e  $1,19 \log_{10}$  no dia 5. Os valores podem ser visualizados na tabela 19 e no gráfico 6.



**Gráfico 6.** Contagem de psicotróficos durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco do presunto cozido fatiado

**Tabela 19.** Contagem de psicrotróficos durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles

	C0	C2	C5	C12	H0	H2	H5	H12
	5,21	6,46	8,46	8,51	5,21	5,84	7,27	8,65
	A	B	C	C	A	F	G	D
Psicrotróficos	P1% 0	P1% 2	P1% 5	P1% 12	P0,5% 0	P0,5% 2	P0,5% 5	P0,5% 12
	5,21	6,25	8,78	8,73	5,18	6,43	8,54	8,55
	A	H	DE	DE	A	B	CD	CDE

Legenda: C0: controle dia 0; C2: controle dia 2; C5: controle dia 5; C12: controle dia 12; H0: hibisco dia 0; H2: hibisco dia 2; H5: hibisco dia 5; H12: hibisco dia 12; P1% 0: pediocina 1% dia 0; P1% 2: pediocina 1% dia 2; P1% 5: pediocina 1% dia 5; P1% 12: pediocina 1% dia 12; P0,5 0: pediocina 0,5% dia 0; P0,5 2: pediocina 0,5% dia 2; P0,5 5: pediocina 0,5% dia 5; P0,5 12: pediocina 0,5% dia 12. Dados expressos em  $\text{Log}_{10}/\text{mL}$ . Letras diferentes significa que há diferença estatística nos valores para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 5.10.2.2.3 Contagem de *Listeria* spp.

O tratamento com hibisco mostrou um bom efeito nos dias 2 e 5, zerando as contagens desse micro-organismo. As pediocinas 0,5% e 1% atuaram similarmente no dia 5.

A contagem obtida no dia 2 do grupo controle foi igual a encontrada no dia 12 de ambas pediocinas, ou seja, somente no dia 12 que as pediocinas chegaram ao resultado obtido no dia 2 do grupo controle, mostrando assim um controle da multiplicação microbiana.

O hibisco reduziu cerca de 5,19  $\text{log}_{10}$  no dia 2, 5,82  $\text{log}_{10}$  no dia 5 e 3,57  $\text{log}_{10}$  no dia 12. A pediocina 1,0% reduziu 2,38  $\text{log}_{10}$  no dia 2, 1,52  $\text{log}_{10}$  no dia 5 e 1,00  $\text{log}_{10}$  no dia 12. A pediocina 0,5% mostrou redução de 1,62  $\text{log}_{10}$  no dia 2, 1,31  $\text{log}_{10}$  no dia 5 e 1,00  $\text{log}_{10}$  no dia 12.

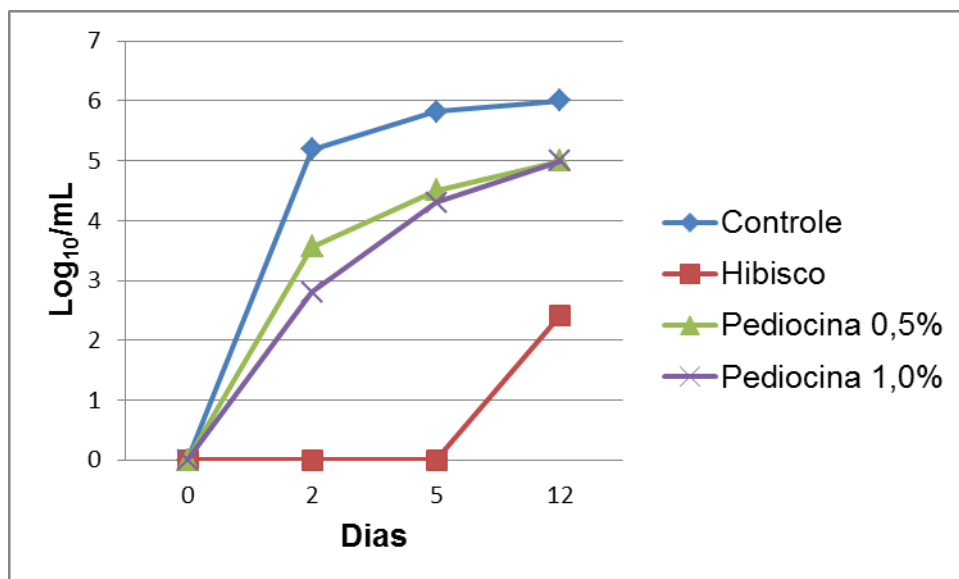
Os valores podem ser visualizados na tabela 20 e no gráfico 7.



**Tabela 20.** Contagem de *Listeria* spp. durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles

	C0	C2	C5	C12	H0	H2	H5	H12
	0	5,19	5,82	6,00	0	0	0	2,42
	A	B	C	C	A	A	A	E
<i>Listeria</i> spp.	P1%	P1%	P1%	P1%	P0,5%	P0,5%	P0,5%	P0,5%
	0	2	5	12	0	2	5	12
	0	2,80	4,30	5,00	0	3,56	4,50	5,00
	A	F	D	B	A	G	D	B

Legenda: C0: controle dia 0; C2: controle dia 2; C5: controle dia 5; C12: controle dia 12; H0: hibisco dia 0; H2: hibisco dia 2; H5: hibisco dia 5; H12: hibisco dia 12; P1% 0: pediocina 1% dia 0; P1% 2: pediocina 1% dia 2; P1% 5: pediocina 1% dia 5; P1% 12: pediocina 1% dia 12; P0,5 0: pediocina 0,5% dia 0; P0,5 2: pediocina 0,5% dia 2; P0,5 5: pediocina 0,5% dia 5; P0,5 12: pediocina 0,5% dia 12. Dados expressos em  $\text{Log}_{10}/\text{mL}$ . Letras diferentes significa que há diferença estatística nos valores para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 7.** Contagem de *Listeria* spp. durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco do presunto cozido fatiado

#### 5.10.2.2.4 Contagem de *E. coli*

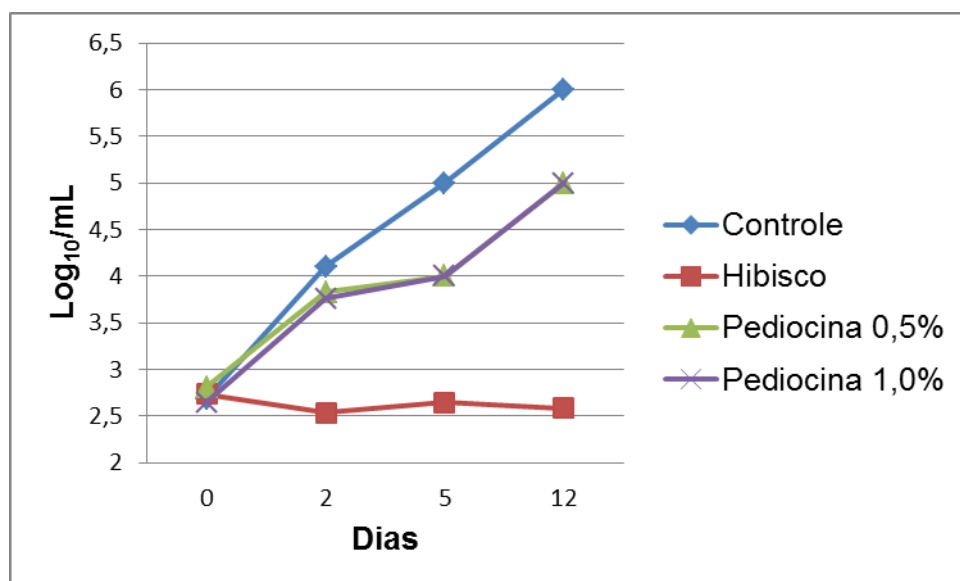
A contagem no dia 0 foi estatisticamente igual entre todos os grupos e ainda foi igual aos dias 2, 5 e 12 do grupo tratado com hibisco, ou seja, o hibisco controlou a multiplicação microbiana, deixando-a constante durante os dias

analisados. As pediocinas mostraram eficiência de atuação igual dias 2 e 5. O hibisco causou redução de  $1,56 \log_{10}$  no dia 2,  $2,34 \log_{10}$  no dia 5 e  $3,41 \log_{10}$  no dia 12. As pediocinas reduziram  $1,00 \log_{10}$  no dia 5 e  $1,00 \log_{10}$  no dia 12. A pediocina 1,0% reduziu  $0,35 \log_{10}$  no dia 2 e a pediocina 0,5% reduziu  $0,27 \log_{10}$  nesse mesmo dia. Os valores podem ser visualizados na tabela 21 e no gráfico 8.

**Tabela 21.** Contagem de *E. coli* durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles

	C0	C2	C5	C12	H0	H2	H5	H12
	2,70	4,10	5,00	6,00	2,73	2,53	2,65	2,60
	A	B	C	E	A	A	A	A
<i>E. coli</i>	P1% 0	P1% 2	P1% 5	P1% 12	P0,5% 0	P0,5% 2	P0,5% 5	P0,5% 12
	2,65	3,75	4,00	5,00	2,81	3,83	4,00	5,00
	A	D	BD	C	A	D	BD	C

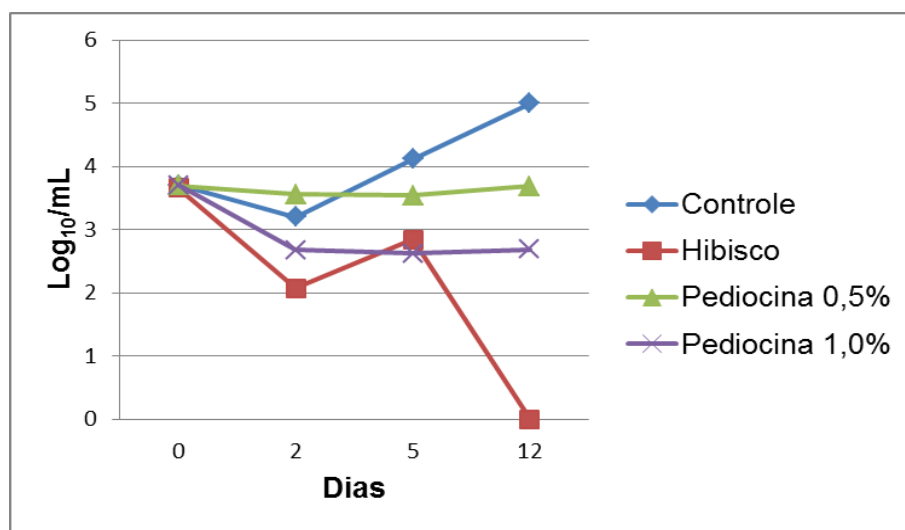
Legenda: C0: controle dia 0; C2: controle dia 2; C5: controle dia 5; C12: controle dia 12; H0: hibisco dia 0; H2: hibisco dia 2; H5: hibisco dia 5; H12: hibisco dia 12; P1% 0: pediocina 1% dia 0; P1% 2: pediocina 1% dia 2; P1% 5: pediocina 1% dia 5; P1% 12: pediocina 1% dia 12; P0,5 0: pediocina 0,5% dia 0; P0,5% 2: pediocina 0,5% dia 2; P0,5% 5: pediocina 0,5% dia 5; P0,5 12: pediocina 0,5% dia 12. Dados expressos em  $\text{Log}_{10}/\text{mL}$ . Letras diferentes significa que há diferença estatística nos valores para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 8.** Contagem de *E. coli* durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco do presunto cozido fatiado

### 5.10.2.2.5 Contagem de *S. aureus*

Pediocina 0,5% e pediocina 1,0% mantiveram a multiplicação microbiana controlada ao longo dos dias. A pediocina 1,0% mostrou eficiência igual ao dia 5 do grupo tratado com hibisco, mostrando novamente maior eficiência por parte do hibisco. O hibisco reduziu 1,13  $\log_{10}$  no dia 2, 1,26  $\log_{10}$  no dia 5 e 4,99  $\log_{10}$  no dia 12. A pediocina 1% mostrou redução de 0,52  $\log_{10}$  no dia 2, 1,48  $\log_{10}$  no dia 5 e 2,30  $\log_{10}$  no dia 12. Já a pediocina 0,5% reduziu 0,35  $\log_{10}$  no dia 2, 0,57  $\log_{10}$  no dia 5 e 1,31  $\log_{10}$  no dia 12. Os valores podem ser visualizados na tabela 22 e no gráfico 9.



**Gráfico 9.** Contagem de *S. aureus* durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco do presunto cozido fatiado

**Tabela 22.** Contagem de *S. aureus* durante o tratamento de 1h e 40min com pediocina e extrato de hibisco do presunto cozido fatiado e similaridade estatística entre eles

	C0	C2	C5	C12	H0	H2	H5	H12
	3,70	3,20	4,11	5,00	3,65	2,07	2,84	0
	A	C	D	E	A	F	B	G
<i>S. aureus</i>	P1%	P1%	P1%	P1%	P0,5%	P0,5%	P0,5%	P0,5%
	0	2	5	12	0	2	5	12
	3,70	2,67	2,62	2,70	3,70	3,55	3,54	3,68
	A	B	B	B	A	A	A	A

Legenda: C0: controle dia 0; C2: controle dia 2; C5: controle dia 5; C12: controle dia 12; H0: hibisco dia 0; H2: hibisco dia 2; H5: hibisco dia 5; H12: hibisco dia 12; P1% 0: pediocina 1% dia 0; P1% 2: pediocina 1% dia 2; P1% 5: pediocina 1% dia 5; P1% 12: pediocina 1% dia 12; P0,5 0: pediocina 0,5% dia 0; P0,5 2: pediocina 0,5% dia

2; P0,5% 5: pediocina 0,5% dia 5; P0,5 12: pediocina 0,5% dia 12. Dados expressos em  $\text{Log}_{10}/\text{mL}$ . Letras diferentes significa que há diferença estatística nos valores para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.10.3 Discussão do Comportamento de Micro-organismos Psicrotróficos, Mesófilos e Patogênicos em Presunto Cozido Fatiado frente ao Tratamento com Pediocina e Extrato de Hibisco

O extrato de hibisco demonstrou maior eficiência e maior espectro de ação, quando comparado à pediocina, frente aos micro-organismos presentes no presunto cozido fatiado, principalmente frente ao controle da multiplicação de *Listeria* spp., podendo assim ser considerado uma estratégia alternativa no controle desses micro-organismos.

As pediocinas tiveram um bom resultado na inibição de *Listeria* spp., comprovando a ação antilisteria esperada por essa bacteriocina. Também demonstraram em certos casos, alguma capacidade de redução de outros micro-organismos no início dos tratamentos, sugerindo que perderam o efeito ao longo do tempo. Esse fato pode estar relacionado com a capacidade de degradação enzimática dessas estruturas pela microbiota encontrada no presunto fatiado, todavia seria necessário outro estudo correlacionando esse fato.

Pattanayaiying, Kittikun e Cutter (2015) realizaram um estudo no qual incorporaram nisina Z em embalagens que envolvem alimentos cárneos prontos para o consumo, com isso observaram que essa bacteriocina conseguiu controlar a carga microbiana de *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli* em determinado período, sendo que para *S. aureus* as contagens oscilaram (aumentando e diminuindo a população) no período de tempo analisado, a pediocina aplicada no presente estudo mostrou pouca oscilação, tanto é que a carga microbiana de *S. aureus* foi considerada estatisticamente constante. No mesmo estudo de Pattanayaiying, Kittikun e Cutter (2015) ainda pode-se observar que a nisina Z não foi capaz de controlar *L. monocytogenes*, uma vez que a população desse patógeno cresceu significativamente durante a estocagem. No presente estudo, pediocina conseguiu reduzir a zero no dia 2 a carga microbiana no experimento que permaneceu submerso continuamente, porém perdeu sua eficácia já no dia 5.

No experimento que ficou 1 hora e 40min em contato com os tratamentos, houve redução da carga microbiana de *Listeria* sp. nos dias analisados, porém ela

aumentou ao longo do tempo, de forma mais amena e foi eficaz contra esse patógeno. No estudo de Pattanayaiying, Kittikun e Cutter (2015), nisina Z mostrou-se ineficaz contra *E. coli* O111, todavia mostrou oscilação na contagem desse micro-organismo (reduzindo entre 0,2 a 0,4  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> após o dia 14), no presente estudo, pediocina mostrou redução variando entre 1 a 0,5  $\log_{10}$ , uma vez que se é esperado que essas bacteriocinas não atuem em bactérias gram-negativas sugere-se que nisina e pediocina podem ter predisposto um ambiente favorável a micro-organismos competidores de *E. coli*, explicando assim essa diminuição da população dessa bactéria.

Ruiz et al (2010) observaram o crescimento de *L. monocytogenes* em presunto de peru tratados com nisina, constatando que nisina 0,5% frente *L. monocytogenes*, foi efetiva, reduzindo cerca de 4  $\log_{10}$  UFC/g durante 14 dias de análise, já no presente estudo, pediocina 0,5% do experimento submerso continuamente no tratamento, reduziu cerca de 4,5  $\log_{10}$  UFC/mL no dia 2, sendo que após isso foi ineficiente, já a pediocina 1,0% e pediocina 0,5% do experimento que permaneceu 1 hora e 40min em contato com os tratamentos, reduziram cerca de 2  $\log_{10}$  UFC/mL e 1,6  $\log_{10}$  UFC/mL no dia 2, respectivamente. Já no dia 5 e 12 reduziram em média 1,5  $\log_{10}$  UFC/mL. Essa diferença pode-se dar ao fato de Ruiz et al (2010) terem realizado um inóculo de *L. monocytogenes* no alimento, diferindo do presente estudo, o qual o alimento já veio contaminado com esse micro-organismo e ainda acompanhado de uma microbiota desconhecida.

Ravishankar et al (2012) incorporaram extrato de hibisco, carvacrol e cinamaldeído em plásticos filme alimentícios a fim de testarem sua atividade antimicrobiana em presunto e mortadela fatiados, ambos inoculados com *L. monocytogenes*. Foi observada uma redução desse patógeno de até 3  $\log_{10}$  UFC/mL da associação de extrato de hibisco com carvacol e redução inferior a 1  $\log_{10}$  UFC/mL de extrato de hibisco com cinamaldeído.

Jaroni e Ravishankar (2012) verificaram a atividade antibacteriana de extrato de hibisco frente a *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica*. e *E. coli* O157:H7 *in vitro* e em alface e alfafa. Observaram uma redução de até 7  $\log_{10}$  UFC/mL de *L. monocytogenes*, sendo que após 72 horas não conseguiram mais detectar a presença desse patógeno. Frente a *E. coli* e *Salmonella enterica* em 24 horas já não

foi mais possível detectar a presença de ambos patógenos tanto *in vitro* como em alface e alfafa.

Olaleye (2007) conduziu um estudo sobre a citotoxicidade e atividade antimicrobiana de extrato de hibisco, sendo que foi eficaz contra *S. aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marseilles*, *Clostridium sporogenes*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescens*. Para verificar a citotoxicidade, utilizou camarões e a dose letal que matou 50% da população foi com o valor de 55.1 ppm.

Paim et al (2015) conduziram um estudo no qual avaliaram o efeito anti-*Escherichia coli* do extrato de hibisco, sendo utilizado como aditivo alimentar na carne bovina moída. Com isso foi possível observar o decréscimo de 2 log<sub>10</sub>UFC/mL. Nesse trabalho também foi avaliado o comportamento de mesófilos frente a esse extrato, sendo que houve uma redução de 1 a 2 log<sub>10</sub>UFC/mL na contagem de micro-organismos mesófilos. No atual estudo, o tratamento submerso continuamente com hibisco reduziu mesófilos em 2 a 3 log<sub>10</sub>UFC/mL e no tratamento submerso durante 1 hora e 40 minutos em extrato de hibisco, mesófilos foram reduzidos em torno de 1 log<sub>10</sub>UFC/mL.

Ruban e Gajalakshmi (2012) pesquisaram *in vitro* a atividade antibacteriana de extrato de hibisco contra patógenos humanos, sendo relatado que esse extrato mostrou atividade contra *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Salmonella* sp., *P. aeruginosa*, *Streptococcus* sp. e *S. aureus*.

Em resumo, tanto o experimento com o presunto cozido fatiado submerso continuamente no tratamento quanto o submerso por 1 hora e 40 minutos demonstraram maior efetividade contra *Listeria* spp. nos dias 2, 5 e 12 quando tratados com extrato de hibisco. A pediocina 0,5% foi mais eficaz contra esse patógeno quando submersa continuamente no tratamento, porém também demonstrou atividade contra essa bactéria quando submersa por 1 hora e 40 minutos.

A pediocina 0,5% não é uma boa alternativa no controle para micro-organismos mesófilos e nem psicrotóxicos, em ambos experimentos demonstraram pouca ou nenhuma redução bacteriana sobre esses micro-organismos. A pediocina 1% tem pouca ação nesses micro-organismos também, porém ainda é melhor que a pediocina 0,5%, uma vez que conseguiu estabilizar o crescimento microbiano

mesofílico e psicrotrófico nos dias 2 e 5, porém depois perdeu o efeito. O extrato de hibisco teve uma melhor resposta frente a esses micro-organismos que as pediocinas.

O extrato de hibisco foi eficiente frente à *E. coli*, uma vez que se pode observar uma estabilização do crescimento microbiano em ambos experimentos. As pediocinas tiveram fraca ação frente a esse micro-organismo.

*S. aureus* não foi detectado no experimento submerso continuamente, sendo que no experimento submerso por 1 hora e 40 minutos, tanto a pediocina 0,5% quanto a pediocina 1,0% mantiveram a carga microbiana controlada ao longo dos dias. O extrato de hibisco teve boa ação no controle dessa bactéria também.

Uma vez que se buscam aditivos naturais para indústria alimentícia, pode-se dizer, através dos dados obtidos, que o extrato de hibisco tem bom potencial como conservante de alimentos, podendo ter suas propriedades exploradas também para a possibilidade de desenvolvimento de algum produto sanitizante que possa ser utilizado industrialmente, sendo uma boa estratégia contra *Listeria monocytogenes*, uma vez que esse patógeno tem natureza ubíqua e por ser capaz de resistir à erradicação feita no local de processamento de alimentos (CARPENTIER E CERF, 2011).

#### 5.11 CONTAGEM E PESQUISA DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS, BACTÉRIAS MESÓFILAS E PSICROTRÓFICAS OBTIDAS DE SUABE DE SUPERFÍCIE

Visto a quantidade de micro-organismos encontrados em presunto cozido fatiado oriundo do mercado público de Porto Alegre, a Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde – Equipe de Alimentos, acompanhou as coletas de suabes de superfície nas Bancas do mercado público, uma vez que a causa da contaminação da peça cárnea de presunto ficou bem evidente ao compará-la com a peça inteira analisada. O objetivo dessa etapa foi verificar se a principal fonte de contaminação do presunto realmente é o ambiente em que ele é fatiado. Foram coletados suabes em duplicata de superfície que entra em contato com o alimento, de fatiador de alimentos, de utensílio (faca/espátula) e de mão dos manipuladores (após lavagem). Também foram coletadas novas amostras de presunto cozido fatiado para contagem de coliformes totais e fecais.

### 5.11.1 Contagem de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos em suabes coletados no mercado público

A contagem de mesófilos em fatiador variou entre 3,720 Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup> (5,2 x10<sup>3</sup> UFC/cm<sup>2</sup>) a 5,386 Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup> (2,4 x10<sup>5</sup> UFC/cm<sup>2</sup>) e psicrotróficos 4,376 Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup> (3,3 x 10<sup>3</sup> UFC/cm<sup>2</sup>) a 5,328 Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup> (2,1 x10<sup>5</sup> UFC/cm<sup>2</sup>). Em contagem de suabe de mãos, mesófilos ficou entre 3,113 Log<sub>10</sub>/mão de manipulador (1,3 x10<sup>3</sup> UFC/mão de manipulador) a 4,453 Log<sub>10</sub>/mão de manipulador (2,8 x10<sup>4</sup> UFC/mão de manipulador) e a de psicrotróficos entre 0 a 4,150 Log<sub>10</sub>/mão de manipulador (1,4 x10<sup>4</sup> UFC/mão de manipulador), como mostra a tabela 23.

A contagem oriunda de suabe de superfície de contato variou entre 4,375 Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup> (2,3 x10<sup>4</sup> UFC/cm<sup>2</sup>) a 5,400 Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup> (2,6 x10<sup>5</sup> UFC/cm<sup>2</sup>) para mesófilos e 3,361 Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup> (2,3 x10<sup>3</sup> UFC/cm<sup>2</sup>) a 5,602 Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup> (2,0 x10<sup>5</sup> UFC/cm<sup>2</sup>) para psicrotróficos. Finalmente a contagem de mesófilos em utensílios variou entre 3,969 Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup> (9,3 x10<sup>3</sup> UFC/cm<sup>2</sup>) a 4,838 Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup> (6,9 x10<sup>4</sup> UFC/cm<sup>2</sup>) e a de psicrotróficos, entre 3,812 Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup> (6,5 x10<sup>3</sup> UFC/cm<sup>2</sup>) a 4,313 Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup> (4,0 x10<sup>5</sup> UFC/cm<sup>2</sup>).

**Tabela 23.** Contagem de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos presentes em suabes do ambiente do mercado público

		Mesófilos	Psicro- tróficos			Mesófilos	Psicro- tróficos
<b>Banca A</b>	Fatiador	4,153	4,091	<b>Banca C</b>	Fatiador	5,386	5,328
	Mão*	4,453	4,150		Mão*	4,324	3,462
	Superfície	5,400	5,317		Superfície	5,425	5,602
	Utensílio	4,424	4,287		Utensílio	3,969	3,812
<b>Banca B</b>	Fatiador	4,376	3,528	<b>Banca D</b>	Fatiador	3,720	4,579
	Mão*	3,949	2,477		Mão*	3,113	0
	Superfície	4,375	3,361		Superfície	4,491	4,301
	Utensílio	4,838	4,235		Utensílio	4,717	4,313

Legenda: dados expressos em Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup>; \*Dados expressos em Log<sub>10</sub>/mão de manipulador.

Não há nenhuma lei que padronize ou coloque um limite máximo na contagem total de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos. Segundo a *Health Protection Agency* (Reino Unido, 2009), a contagem total satisfatória deve ser abaixo



de  $10^4$  UFC/g para produtos cárneos cozidos. Já para Bressan et al (2007), adotou como limite de qualidade valores máximos de contagem de até  $10^3$ UFC/g de mesófilos. Com os dados gerados se considerarmos como limite de qualidade uma contagem com até  $10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> ( $3 \text{ Log}_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>) haveriam apenas 2 amostras com padrão sanitário satisfatório.

Pode-se concluir com isso que a contaminação da peça inteira de presunto é dada pelo processamento e pelo ambiente em que ele é fatiado, havendo uma carência em boas práticas de fabricação e programa de higienização de equipamentos, predispondo a contaminação do alimento.

Através dos valores gerados no presente estudo, sugere-se a necessidade de atualização da legislação brasileira, criando um limite tolerável e máximo desses micro-organismos em setor alimentício, uma vez que segundo a *Health Protection Agency* (Reino Unido, 2009), dependendo o tipo de micro-organismo presente, altera a qualidade organoléptica dos alimentos.

#### 5.11.2 Contagem de *Listeria* spp. em suabes coletados no mercado público

A contagem de *Listeria* spp. foi realizada em duplicata no ágar ALOA, os resultados apresentaram variação de 2,204  $\text{Log}_{10}/\text{cm}^2$  ( $1,6 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>) na superfície banca D até 4,345  $\text{Log}_{10}/\text{cm}^2$  ( $2,2 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>) na superfície da banca C, como ilustra a tabela 24.

**Tabela 24.** Contagem de *Listeria* spp. presente em suabes do ambiente do mercado público

<i>Listeria</i> spp.			<i>Listeria</i> spp.		
<b>Banca A</b>	Fatiador	2,991	<b>Banca C</b>	Fatiador	3,800
	Superfície	2,380		Superfície	4,345
	Utensílio	2,806		Utensílio	2,505
<b>Banca B</b>	Fatiador	3,296	<b>Banca D</b>	Fatiador	3,139
	Superfície	3,120		Superfície	2,204
	Utensílio	3,482		Utensílio	2,991

Legenda: Valores das médias da contagem em duplicata. Dados expressos em  $\text{Log}_{10}/\text{cm}^2$

Em fatiador de alimentos isolaram-se 2 colônias de *Listeria monocytogenes*, uma pertencente ao sorotipo 1/2b (banca A) e outro do sorotipo 4b

(banca D). A ocorrência de cada sorotipo obtida no presente estudo, tanto em presunto cozido fatiado quanto em suabe de fatiador de alimentos, foi de 42,9% do sorotipo 1/2b (3); 28,5% do sorotipo 1/2c (2); 14,3% do sorotipo 1/2a (1) e 14,3% do sorotipo 4b (1). Em outro estudo desenvolvido no sul do Brasil por Haubert (2015) foi detectada a ocorrência dos sorotipos de *L. monocytogenes* oriundos de alimentos e de indústria de alimentos, também tendo o sorotipo 1/2b (42%) como o mais prevalente, convergindo com o que foi observado nesse trabalho. Haubert (2015) também detectou os sorotipos 4b (26%), 1/2c (22%) e 1/2a (10%), os mesmos detectados nesse trabalho.

Camargo et al (2016) fizeram a sorotipificação de *L. monocytogenes* isoladas de amostras clínicas, ambientais e de alimentos, obtendo o seguinte resultado quanto aos sorotipos: 1/2c (53%); 4b (22%); 1/2b (16%) e 1/2a (9%). Bueno et al (2010) sorotipificou amostras de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos e amostras clínicas e obteve o seguinte resultado: 4b (49%); 1/2b (30%); 1/2a (10%); 1/2c (6%); 3c (3%) e 3b (2%). Sakate et al (2003) pesquisou a presença de *L. monocytogenes* em diferentes tipos e marcas de salames fatiados comercializados em São Paulo, detectando a bactéria em 6,7% (3/45), contendo os sorotipos 1/2a e 1/2b. Martins (2011) detectou em salame e presunto cozido fatiado os seguintes sorotipos: 4b (37,5%); 1/2b (25%); 3b (35%) e 1/2c (12,5%).

Com esses dados literários pode-se concluir que os sorotipos mais encontrados entre os isolados de *L. monocytogenes* são 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, variando a incidência entre si, provavelmente de acordo com a região brasileira estudada. Mesmo com o predomínio de algum sorotipo sobre os demais, pode-se observar a presença contínua desses 4 sorotipos em grande parte dos estudos realizados.

### 5.11.3 Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em suabes coletados no mercado público

Foi realizada em ágar Baird-Parker, em duplicata, a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva dos suabes do fatiador, de utensílio, de superfície de contato e de mão de manipulador de alimentos, das bancas do mercado público. Os valores mínimo e máximo obtidos foram de 0 a 2,892

Log<sub>10</sub>/mão de manipulador ( $7,8 \times 10^2$  UFC/mão de manipulador), tendo valor máximo em suabe da mão de manipulador da banca A, como demonstra a tabela 25.

Selecionaram-se então 13 colônias características das contagens realizadas em Baird-Parker, as quais foram submetidas à prova da coagulase em tubo, porém nenhuma foi capaz de coagular o plasma de coelho. Para esse teste de coagulase foi utilizado como controle positivo o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**Tabela 25.** Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva presentes em suabes do ambiente do mercado público

S. Coagulase Positiva			S. Coagulase Positiva		
<b>Banca A</b>	Fatiador	0	<b>Banca C</b>	Fatiador	1,602
	Mão*	2,892		Mão*	2,397
	Superfície	2,146		Superfície	2
	Utensílio	0		Utensílio	0
<b>Banca B</b>	Fatiador	0	<b>Banca D</b>	Fatiador	0
	Mão*	1,698		Mão*	2,544
	Superfície	1,301		Superfície	0
	Utensílio	1,301		Utensílio	1,778

Legenda: Valores das médias da contagem em duplicata. Dados expressos em Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup>; \* Dados expressos em Log<sub>10</sub>/mão de manipulador.

Após a prova da coagulase em tubo, pode-se dizer que os resultados de *Staphylococcus* coagulase positiva nesse estudo foram negativos, fato similar ocorreu nos presuntos cozidos fatiados analisados por Tonello e Eckert (2013), por Fachinello e Casaril (2013), por Caus et al (2007). No trabalho conduzido por Menezes, Coelho e Costa (2010), obtiveram-se valores de contagens de *Staphylococcus* sp. em presuntos fatiados, todavia quando submetidos a prova de coagulase, também foram incapazes de coagular o plasma de coelho, convergindo com o atual estudo, estando dentro do exigido pela legislação (tolerância de até  $3 \times 10^3$  UFC/ml). Através desses dados pode-se concluir que a higienização adequada das mãos, as quais são a maior fonte de contaminação dessa bactéria, é uma medida efetiva contra a veiculação desse patógeno no alimento.

#### 5.11.4 Contagem de coliformes totais e fecais em suabes e presunto cozido fatiado coletados no mercado público

Realizou-se em meio cromogênico a contagem em duplicata de coliformes totais e fecais dos suabes coletados nas bancas do mercado público. Juntamente com a coleta dos suabes, coletou-se ainda uma amostra de presunto fatiado para quantificação desses micro-organismos nesse alimento. Os valores obtidos da contagem de coliformes totais variaram de 0 a 4,327 Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup> (2,1 x10<sup>4</sup>UFC/cm<sup>2</sup>), tendo valor máximo na superfície da banca A. Já a contagem de coliformes fecais variou de 0 a 2,892 Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup> (7,8 x10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>), tendo seu valor máximo no fatiador de alimentos da banca C, como demonstra a tabela 26.

**Tabela 26.** Contagem de coliformes totais e fecais presentes em presunto fatiado e no ambiente do mercado público

		C.	C.			C.	C.
		Totais	Fecais			Totais	Fecais
<b>Banca A</b>	Fatiador	2,880	0	<b>Banca C</b>	Fatiador	3,338	2,892
	Mão**	2,176	0		Mão**	0	0
	Superfície	4,327	0		Superfície	3,563	0
	Utensílio	3,570	1,301		Utensílio	0	0
	Presunto*	3,017	2,000		Presunto*	3,418	2,880
<b>Banca B</b>	Fatiador	3,204	0	<b>Banca D</b>	Fatiador	2,732	0
	Mão**	0	0		Mão**	0	0
	Superfície	2,792	0		Superfície	3,354	0
	Utensílio	3,837	0		Utensílio	3,639	0
	Presunto*	3,755	1,602		Presunto*	2,414	0

Legenda: Valores das médias da contagem em duplicata. Dados expressos em Log<sub>10</sub>/cm<sup>2</sup>; \*Dados expressos em Log<sub>10</sub>/mL; \*\*Dados expressos em Log<sub>10</sub>/mão de manipulador.

A legislação brasileira RDC nº 12 de Janeiro de 2001 estabelece um limite de até 10<sup>3</sup> UFC/g (3 Log<sub>10</sub>UFC/g) de coliformes crescidos a 45°C/g (coliformes fecais ou termotolerantes), sendo assim, nenhuma amostra está fora da legislação nas contagens de coliformes fecais. Se usar o mesmo padrão para coliformes totais, 11 das contagens obtidas estão fora dos padrões exigidos, sugerindo falta de boas práticas higiênico-sanitárias desses estabelecimentos e contaminação do alimento.

Menezes, Coelho e Costa (2010) analisaram presuntos cozidos fatiados, sendo que 66,6% apresentaram coliformes totais e 23,3%, coliformes fecais. Caus et al (2007), detectaram 6,25% da presença de coliformes fecais em presunto cozido fatiado, todavia estavam abaixo do limite máximo exigido pela legislação, como no presente estudo. Fachinello e Casaril (2013) detectaram 21,4% de coliformes fecais em presunto cozido fatiado, porém à presença de coliformes fecais, estava dentro do limite exigido pela legislação. Tonello e Eckert (2013) detectaram 50% de coliformes fecais em presunto cozido fatiado, todavia não fizeram a quantificação desses micro-organismos, não se podendo dizer se as amostras atendiam ou não a legislação.

## 6. CONCLUSÕES

Pela crescente preocupação com a inocuidade dos alimentos, a indústria alimentícia padroniza uma série de programas para controlar a veiculação de micro-organismos que por ventura podem estar presentes nos alimentos ou no ambiente que os mesmos são processados. Esse fato é garantido desde a chegada da matéria prima na indústria até o produto final chegar às mãos dos consumidores. Ao observarem-se os dados gerados nesse estudo, a indústria mostrou excelente eficácia no controle da peça cárnea que foi analisada, no entanto o ambiente no qual a peça inócua foi seccionada e distribuída para o consumidor final, acabou por contaminar e carrear micro-organismos, inclusive patogênicos, nesse alimento. Pelos níveis bacterianos encontrados nos suabes de fatiador de alimentos, utensílio e superfície de contato, pode-se associar a contaminação do presunto através do ambiente de comercialização e ainda pode-se concluir que o mesmo apresenta carências de boas práticas de fabricação, higienização inadequada dos equipamentos e falta de treinamento dos funcionários perante essas práticas e de manuseio adequado do alimento.

Uma vez que esse produto não sofre mais nenhum processo térmico ao ser fatiado, pode ocorrer à veiculação de bactérias nos alimentos e conseqüentemente a diminuição da vida de prateleira do produto por ação enzimática microbiana. Nesse trabalho pode ser visto que grande parte das bactérias psicrotróficas apresentou atividade proteolítica e lipolítica, as quais alteram organolepticamente o produto. Ainda verificou-se que algumas dessas bactérias apresentaram produção de biofilme e capacidade de aderência em aço inoxidável, fato indesejado na indústria de alimentos, uma vez que o quando o biofilme é formado, torna-se mais difícil a remoção e erradicação de micro-organismos no ambiente de processamento industrial.

Através dos dados gerados no estudo, pode-se mencionar que a legislação brasileira apresenta uma carência em termos de pesquisa de micro-organismos psicrotróficos em produtos cárneos mantidos refrigerados, em consequência da presença dos mesmos terem surgido em níveis consideráveis nas análises realizadas. Algumas alternativas podem ser ministradas a fim de controlar não só a carga microbiana de psicrotróficos, como também de uma grande faixa de

micro-organismos em geral, como a adição de componentes com potencial antimicrobiano nesse alimento.

Reparou-se que através do uso de componentes naturais houve redução da quantidade microbiana presente no presunto. O extrato de hibisco demonstrou ação frente a todos os micro-organismos quantificados, destacando-se a redução de *Listeria monocytogenes*. Já a pediocina demonstrou ação também frente a esse mesmo patógeno, porém com o passar do tempo perdeu eficiência, fato esse que pode ser dado pela degradação do composto pela microbiota presente no alimento. Uma vez que se buscam aditivos naturais para indústria alimentícia, pode-se dizer, através dos dados obtidos, que o extrato de hibisco tem bom potencial como conservante de alimentos, podendo ter suas propriedades exploradas para o desenvolvimento de algum produto conservante ou até mesmo sanitizante, evitando a proliferação microbiana e atuando na erradicação no setor industrial, respectivamente.

## 7. REFERÊNCIAS

### Artigos:

- ABEE, T.; KOVACS, A. T.; KUIPERS, O. P.; VAN DER VEEN, S. 2011. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 22:172–179.
- AHMED, K., DAS, K. K., GEORGE, S. 2015. Bacterial flora of poultry semen and their antibiotic sensitivity pattern. *International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture*. 1(7): 39:41
- ALAPONT, C., MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V., LÓPEZ-MENDOZA, M. C. 2014. Determination of lipolytic and proteolytic activities of microflora isolated from dry-cured teruel ham. *Journal of Food and Science Technology*. 52(8):5250:5256.
- ALTUNATMAZ, S. S., ISSA, G., AYDIN, A. 2012. Detection of airborne psychrotrophic bacteria and fungi in food storage refrigerators. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012:1436:1443
- ANDRADE, R. R. de; SILVA, P. H. C. da; SOUZA, N. R.; MURATA, L. S.; GONÇALVES, V. S. P.; SANTANA, A. P. 2014. Ocorrência e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. em salsichas tipo *hot dog* a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal. *Revista Ciência Rural*, 44(1):147:152.
- ANDRADE, J. A. B., HAAPALAINEN, E. F., NETO, U. F. 2011. *Escherichia coli* enteroagregativa como agente provocador de diarreia persistente: modelo experimental utilizando microscopia óptica de luz. *Revista Paulista de Pediatria*, 29 (1): 60-66.
- ARAÚJO, P. C. C., FRANCO, R. M., OLIVEIRA, L. A. T., CARVALHO, J. C. A. P. 2002. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in turkey's meat products commercialized in Niteroi country-RJ-Brazil. *Acta Scientiae veterinariae*. (30):19-25.
- BAE, Y. M., BAEK, S. Y., LEE, S. Y. 2012. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of



- chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*. (153):465-473.
- BARBALHO, T. C. F., ALMEIDA, P. F., ALMEIDA, R. C. C., HOFER, E. 2005. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and phage test for rapid confirmation of suspect colonies. *Food Control*. 16:211-216.
- BARBOSA, J., BORGES, S., CAMILO, R., MAGALHÃES, R., FERREIRA, V., SANTOS, I., SILVA, J., ALMEIDA, G., TEIXEIRA, P. 2013. Biofilm formation among clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Microbiology*. 2013:1-6.
- BARBOSA, W. B., CABEDO, L., WEDERQUIST, H. J., SOFOS, J. N., SCHMIDT, G. R. 1994. Growth variations among species and strains of *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*. 57:765-769.
- BARROS, J. R., KUNIGK, L., JURKIEWICZ, C. H. 2010. Incorporation of nisin in natural casing for the control of spoilage microorganisms in vacuum packaged sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41(4):1001-1008.
- BASTOS, H. M., LOPES, L. F. L., GATTAMORTA, M. A., MATUSHIMA, E. R. 2008. Prevalence of *Enterobacteria* in *Bothrops jararaca* in São Paulo state: microbiological survey and antimicrobial resistance standards. *Acta Scientiarum Biological Sciences*. 30(3):321-326.
- BAYOUMI, M. A., KAMAL, R. M., ABD EL AAL, S. F., AWAD, E. I. 2012. Assessment of regulatory sanitization process in Egyptian dairy plants in regard to the adherence of some food-borne pathogens and their biofilms. *International Journal of Food Microbiology*. 158(3):225-231.
- BENECH, R.O., KHEADR, E.E., LRIDI, R., LACROIX, C., FLISS, I. 2002. Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(8):3683-3690.
- BONNET, M.; MONTVILLE, T. J. 2005. Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. *Letters in Allied Microbiology*. 40:237-242.
- BORCH, E., KANT-MUERMANS, M. L., BLIXT, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 33:103-120.

- BRANCO, M. A. de A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T. de; BORGES, M. de F.; SILVA, M. C. D. da; DESTRO, M. T. 2003. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos. 21(2):393-408.
- BRANDA, S. S., VIK, S., FRIEDMAN, L., KOLTER, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. Trends in Microbiology. 13:20-26.
- BRESSAN, M. C., LODI, F., FERREIRA, M. W., ANDRADE, P. L., BOARI, C. A., PICCOLI, R. H. 2007. Influência da embalagem na vida útil de presuntos fatiados. Ciência e Agrotecnologia. 31(2):433-438.
- BUCHON, L.; LAURENT, P.; GOUNOT, A. M.; GUESPIN-MICHEL, J. F. 2000. Temperature dependence of extracellular enzymes production by psychrotrophic and psychrophilic bacteria. Biotechnology Letters. 22:1577-1581.
- BUENO, V. F., BANERJEE, P., BANADA, P. P., MESQUITA, A. J., LEMES-MARQUES, E. G., BHUNIA, A. K. 2010. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated of food and human origins from Brazil using molecular typing procedures and in vitro cell culture assays. International Journal of Environmental Health Research, 20(1):43-59.
- CAMARGO, A. C., VALLIM, D. C., HOFER, E., NERO, L. A. 2016. Molecular serogrouping of *Listeria monocytogenes* from Brazil using PCR. Journal of Food Protection. 79(1):144-147.
- CARPINÉ, D., DAGOSTIN, J. L. A., DALLA SANTA, H. S., ALVAREZ, D. C., TERRA, N. N., DALLA SANTA, O. R. 2010. Atividade proteolítica e lipolítica de bactérias lácticas isoladas de salames artesanais. Ambiência Guarapuava. 6(1):125-132.
- CARPENTIER, B., CERF, O. 2011. Review – persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. International Journal of Food Microbiology. 145:1-8.
- CARRASCO, E., PÉREZ-RODRÍGUEZ, F., VALERO, A., GARCÍA-GIMENO, R. M., ZURERA, G. 2007. Survey of temperature and consumption patterns of fresh-cut leafy green salads: risk factors for listeriosis. Journal of Food Protection. 70(10):2407-2412.

- CASARIN, L. S., BRANDELLI, A., CASARIN, F. O., SOAVE, P. A., WANKE, C. H., TONDO, E. C. 2014. Adhesion of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on stainless steel welds. *International Journal of Food Microbiology*. 191:103-108.
- CHAE, M. S., SCHRAFT, H. 2000. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 62:103-111.
- CHAMPAGNE, C. P. ; LAING, R. R.; ROY, D.; MAFU, A. A. ; GRIFFITHS, M. W. 1994. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 34(1):1-30.
- CHAO, C. Y., YIN, M. C. 2009. Antibacterial Effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. *Foodborne Pathogens and Diseases*. 6(2):201-206.
- CHERRY, J. P. 1999. Improving the safety of fresh produce with antimicrobials. *Food technology*. 53:54-59.
- CHEWONARIN, T., KINOUCI, T., KATAOKA, K. 1999. Effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn), a Thai medicinal plant, on the mutagenicity of various know mutagens in *Salmonella* Typhimurium and formation of aberrant crypt foci induced by the colon carcinogens azoxymethane and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-b] in F344 rats. *Food Chemistry and Toxicology*. 37:591-601.
- CHRISTENSEN, G.D., SIMPSON, W.A., YOUNGER, J.J., BADDOUR, L.M., BARRETT, F.F., MELTON, D.M. AND BEACHEY, E.H. 1985. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*. 22:996–1006.
- CHUSRI, S.; PHATTHALUNG, P. N.; VORAVUTHIKUNCHAI, S.P. 2012. Anti-biofilm activity of *Quercus infectoria* G. Olivier against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*. 54:511–517.
- CIOFU, O., TOLKER-NIELSEN, T., JENSEN, P. O., WANG, H., HOLBY, N. 2015. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 85:7-23.

- COSTERTON, J. W., LEWANDOWISKI, Z., CALDWELL, D. E. 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 49:711-745.
- DAVEY, M .E.; O'TOOLE, G.A. 2000. Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(4):847-867.
- DAVIES, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews in Drug Discovery*. 2:114-122.
- DEETH, H. C. 2006. Lipoprotein lipase and lipolysis in Milk. *International Dairy Journal*. 16:555–562.
- DOIJAD, S. P., BARBUDDHE, S. B., GARG, S., PAHARKAR, K. V., KALOREY, D. R., KURKURE, N. V., RAWOOL, D. B., CHAKRABORTY, T. 2015. Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. *PLoS ONE*. 10(9):e0137046
- DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; NASIS, P.; GALIOTOU, M.; METAXOPOULOS, J. 2005. Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Journal of Applied Microbiology*. 99(6):1314-1323.
- DYKES, G. A. 2003. Influence of the adaptation of *Listeria monocytogenes* populations to structured or homogeneous habitats on subsequent growth on chilled processed meat. *International Journal of Food Microbiology*. 85:301-306.
- EGAN, A. F. 1983. Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 49:327-336.
- ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. 2000. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *International Dairy Journal*. 10:325-331.
- ERDMAN, I. E., THATCHER, F. S., MCQUEEN, K. F. 1961. Studies on the irradiation of microorganisms in relation to food preservation the comparative sensitive of specific bacteria of public health significance. *Canadian Journal of Microbiology*. 7:199-205.
- ESPITIA, P. J. P.; PACHECO, J. J. R.; MELO, N. R. de; SOARES, N. de F. F.; DURANGO, A. M. 2013. Packaging properties and control of *Listeria*

- monocytogenes* in Bologna by cellulosic films incorporated with pediocin. Brazilian Journal of Food Technology. 38(3):226-235.
- FACHINELLO, J. P., CASARIL, K. B. P. B. 2013. Avaliação da qualidade microbiológica de presuntos fatiados, comercializados no município de Francisco Beltrão, Paraná. Brazilian Journal of Food and Nutrition. 24(3):333-337.
- FAI, A. E. C., FIGUEIREDO, E. A. T., VERDIN, S. E. F., PINHEIRO, N. M. S., BRAGA, A. R. C., STAMFORD, T. L. M. 2011. *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. Ciência e Saúde Coletiva. 16(2):657-662.
- FARBER, J. M., PETERKIN, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiology Reviews. 55:476-511.
- FARIA, J. de A. F. 2001. Formação e estabilidade da cor de produtos cárneos curados. Revista Tecnologia de Carnes. 1:17-19.
- FARMER, J. J., FANNING, G. R., HUNTLEY-CARTER, G. P., BARRY HOLMES, F. W., HICKMAN, F. W., RICHARD, C., BRENNER, D. J. 1981. *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family *Enterobacteriaceae*: identification of *Kluyvera ascorbata* sp. nov. and *Kluyvera cryocrescens* sp. nov. in clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology. 13(5):919:933.
- FAROMBI, E. O., FAKOYA, A. 2005. Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. Molecular Nutrition and Food Research. 49:1120-1128.
- FERNANDEZ, B., SAVARD, P., FLISS, I. 2015. Survival and metabolic activity of pediocin producer *Pediococcus acidilactici* UL5: its impact on intestinal microbiota and *Listeria monocytogenes* in a model of the human terminal ileum. Microbial Ecology Journal. 72(4):931-942.
- FLEMMING, H. C., WINGENDER, J. 2010. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology. 8:623-633.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL. 2011. Shelf life: uma pequena introdução. Revista Food Ingredients Brasil. 18:67-73.
- FRAZIER, W. C., RUPP, P. 1928. Studies on the proteolytic bacteria of milk. Journal of Bacteriology. 16(3):187-196.

- FREEMAN, D. J., FALKINER, F. R., KEANE, C. T. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative *Staphylococci*. *Journal of Clinical Pathology*. 42(8):872-874.
- FRIEDMAN, M., ZHU, L., FEINSTEIN, Y., RAVISHANKAR, S. 2009. Carvacrol facilitates heat-induced inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and inhibits formation of heterocyclic amines in grilled ground beef patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:1848-1853.
- GANDHI, M., CHIKINDAS, M. L. 2007. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*. 113:1-15.
- GARAYOA, R., CÓRDOBA, M., GARCÍA-JALÓN, I., SANCHEZ-VILLEGAS, A. I. 2005. Relationship between consumer food safety knowledge and reported behavior among students from health sciences in one region of Spain. *Journal of Food Protection*. 68(12):2631-2636.
- GODWIN, S. L., CHEN, F., CHAMBERS, E. I. V., COPPING, R., CHAMBERS, D. 2007. A comprehensive evaluation of temperature within home refrigerators. *Food Protection Trends*. 27(3):16-21.
- GONÇALVES, A. C., ALMEIDA, R. C. C., ALVES, M. A. O., ALMEIDA, P. F. 2005. Quantitative investigation on the effects of chemical treatments in reducing *Listeria monocytogenes* populations on chicken breast meat. *Food Control*. 16:617-622.
- GRAHAM, D. M. 1997. Use of ozone for food processing. *Food Technology*. 51:72-75.
- GUPTA, S., RAVISHANKAR, S. 2005. A comparison of the antimicrobial activity of garlic, ginger, carrot and turmeric aqueous extracts against *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory buffer and ground beef. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2:330-340.
- HADDADI, K.; MOUSSAOUI, F.; HEBIA, I.; LAURENT, F.; LE ROUX, Y. 2005. *E. coli* proteolytic activity in milk and casein breakdown. *Reproduction Nutrition Development*. 45:485-496.
- HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J. W., STOODLEY, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2:95-108.

- HALL-STOODLEY, L., STOODLEY, P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiology*. 11:1034-1043.
- HASSAN, A. USMAN, J., KALEEN, F., OMAIR, M., KHALID, A., IQBAL, M. 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 15(4):305:311.
- HAUBERT, L., MENDONÇA, M., LOPES, G. V., CARDOSO, M. R. I., SILVA, W. P. 2015. *Listeria monocytogenes* isolates from food and food environment harbouring *tetM* and *ermB* resistance genes. *Letters in Applied Microbiology*. 62:23-29.
- HENNEKINNE, J. A., BUSYER, M. L. D., DRAGACCI, S. 2011. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*. 36:815-836.
- HERNÁNDEZ, D.; CARDELLE, E.; ZÁRATE, V. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF 711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF 711. *Journal of Applied Microbiology*. 99(6):77-84.
- HOBLEY, L., HARKINS, C., MACPHEE, C. E. 2015. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiology Reviews*. 39:649-669.
- HOFER, E., REIS, C. M. F., HOFER, C. B. 2006. Sorovars of *Listeria monocytogenes* and related species isolated from human clinical specimens. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39(1):32-37.
- HOLLEY, R. A.; GILL, C. O. 2012. Usos da embalagem em atmosfera modificada para carnes e produtos cárneos. Palestra. III Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 27 a 29 de setembro, 2005. apud ALCANTARA, M. de; MORAIS, I. C. L. de; SOUZA, C. de M. O. da C. C. de. Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 6(1):1-20.
- IEREM, I. I., BELLO, M., KWAGA, J. K. P. 2013. Occurrence and antibiotic resistance profile of *Listeria monocytogenes* in salad vegetables and vegetable salads sold in Zaria, Nigeria. *African Journal of Food Science*. 7(9):334-338.

- ISSA, Z. M., MUSTAKIM, M., MOHAMED, S. A. S., MUDA, N. M., RADU, S., YEN, L. H. 2011. Antibioqram profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering. 7:133:137.
- JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. 1994. Bacterial lipases. FEMS Microbiology Reviews. 15:29–63.
- JARONI, D., RAVISHANKAR, S. 2012. Bactericidal effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) against foodborne pathogens *in vitro* and on romaine lettuce and alfafa sprouts. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods. 4:33-40.
- JEMMI, T., STEPHAN, R. 2006. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. Revue Scientifique et Technique. 25(2):571-580.
- JO, C., LEE, N. Y., KANG, H., HONG, S. P., KIM, Y. H., KIM, H. J. BYUN, M. W. 2005. Radio-sensitivety of pathogens in inoculated prepared food of animal origin. Food Microbiology. 22:329-336.
- KATHARIOU, S. 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. Journal of Food Protection. 65(11):1811-1829.
- KAYSER, T. D. L., PEREIRA, E. M., SANTOS, K. R. N., MACIEL, E. L. N., SHUENCK, R. P., NUNES, A. P. F. 2013. Modification of the congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 75:235-239.
- KENNEALLY, P. M., LEUSCHNER, R. G., ARENDT, E. K. 1998. Evaluation of the lipolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. Journal of Applied Microbiology. 84:839-846.
- KOTZEKIDOU, P., BLOUKAS, J. G. 1996. Effect of protective cultures and packaging film permeabilify on shelf-life of sliced vacuum-packed cooked ham. Meat Science. 42:333-345.
- KUMAR, B., KAUR, B., BALGIR, P. P., GANG, N. 2011. Cloning and expression of bacteriocins of *Pediococcus* spp.. Archives of Clinical Microbiology. 2:1-18.
- KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. International Journal of Food Microbiology. 42:9-27.
- KUSUMANINGRUM, H. D., RIBOLDI, G., HAZELGER, W. C., BEUMER, R. R. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-



- contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*. 85(3):227-236.
- LIGIMOL, J., BEENA, A. K., ANUPA, A., SREESHMA, N. 2016. Antibioqram of *Lactobacilli* isolated from four different niches. *Journal of Microbiology & Microbial Technology*. 1(1):1-4.
- LIU, K. S., TSAO, S. M., YIN, M. C. 2005. In vitro antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. *Phytotherapy Research*. 19:942-945.
- LOHANS, C. T., VEDERAS, J. C. 2012. Development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents. *International Journal of Microbiology*. 2012:386410.
- LUNDÉN, J. M., AUTIO, T. J., SJÖBERG, A. M., KORKEALA, H. J. 2003. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *Journal of Food Protection*. 66:2062-2069.
- MARIANA, N. S., SALMAN, S. A., NEELA, V., ZAMBERI, S. 2009. Evaluation of modified congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research*. 3(6):330-338.
- MARKLINDER, I. M., LINDBLAD, M., ERIKSSON, L. M., FINNISON, A. M., LINDQVIST, R. 2004. Home storage temperatures and consumer handling of refrigerated food in Sweden. *Jorunal of Food Protection*. 67(11):2570-2577.
- MARTINS, E. A., GERMANO, P. M. L. 2011. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: occurrence, quantification and serogrouping. *Food Control*. 22:297-302.
- MARTINS, M. L.; PINTO, C. L. O.; ROCHA, R. B.; DE ARAÚJO, E. F.; VANETTI, M. C. D. 2006. Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*. 111:144-148.
- MATHUR, T., SINGHAL, S., KHAN, S., UPADHYAY, D. J., FATMA, T., RATTAN, A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 24(1):25-29.

- MEHRABIAN, S., JABERI, E. 2007. Isolation, identification and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from meat products in Tehran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10(11):122-126.
- MELO, P. C., FERREIRA, L. M., NADER FILHO, A., ZAFALON, L. F., VICENTE, H. I. G., SOUZA, V. 2013. Comparison of methods for detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(1):119-124.
- MENEZES, P. M. S, COELHO, L. M., COSTA, F. N. 2010. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária dos presuntos fatiados comercializados na cidade de São Luís, MA. *Biológico*. 72(1):11-17.
- MONTANHINI, M. T. M., BERSOT, L. S. 2013. Evaluation of psychrotrophic behavior and lipolytic and proteolytic activity of *Bacillus cereus* isolated from refrigerated dairy products. *International Food Research Journal*. 20(3):1417-1420.
- MOTTIN, V. D., FISH, E., MÜRMAN, L., CARDOSO, M. I. 2006. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. em embutidos de carne suína cozidos e fatiados comercializados em supermercados do município de Porto Alegre, RS. *Revista Higiene Alimentar*. 21(150):191-192.
- NASCIMENTO, M. da S. do; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. 2008. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. *Brazilian Journal of Food Technology*. 11(2):120-127.
- NES, I. F., HOLO, H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Peptide Science*. 55:55-61.
- NICODÈME, M.; GRILL, J. P.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. 2005. Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. *Journal of Applied Microbiology*. 99:641-648.
- NÖRNBERG, M. B. L.; MENTGES, M. L.; SILVEIRA, S. T.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. 2011. A psychrotrophic *Burkholderia cepacia* strain isolated from refrigerated raw milk showing proteolytic activity and adhesion to stainless steel. *Journal of Dairy Research*. 78:257–262.
- NYENJE, M. E., TANIH, N., GREEN, E., NDIP, R. N. 2012. Current status of antibiogram of *Listeria ivanovii* and *Enterobacter cloacae* isolated from ready-

- to-eat food in Alice, South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 9:3101-3114.
- OLALEYE, M. T. 2007. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 1(1):9-13.
- OLIVEIRA, M. M. M., BRUGNERA, D. F., ALVES, E., PICCOLI, R. H. 2010. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41:97-106.
- ONYENEKWE, P. C., AJANI, E. O., AMEH, D. A., GAMANIE, K. S. 1999. Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and comparison of its toxicology with that in Wistar rats. *Cell Biochemistry and Function*. 17:199-206.
- ÖSTERBLAD, M., PENSALA, O., PETERZÉNS, M., HELENIUS, H., HUOVINEN, P. 1999. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 43:503-509.
- PAIM, M. P., MACIEL, M. J., WESCHENFELDER, S., BERGMANN, G. P., AVANCINI, C. A. M. 2015. Efeito anti-*Escherichia coli* de *Hibiscus sabdariffa* L. em modelo cárneo. Bento Gonçalves: 5º Simpósio de Segurança Alimentar.
- PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34(9):577-588.
- PAPAGIANNI, M. 2003. Ribosomal synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advances*. 21:465-499.
- PAPAGIANNI, M., ANASTASIADOU, S. 2009. Pediocins: the bacteriocins of *Pediococci*: sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories*. 8:1-16.
- PAPAMANOLI, E., TZANETAKIS, N., LITOPOULOU-TZANETAKI, E., KOTZEKIDOU, P. 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*. 65:859-867.

- PATTANAYAIYING, R., KITTIKUN, A. H., CUTTER, C. N. 2015. Incorporation of nisin Z and lauric arginate into pullulan films to inhibit foodborne pathogens associated with fresh and ready-to-eat muscle foods. *International Journal of food Microbiology*. 207:77-82.
- PEREIRA, M. C., VILELA, G. R., COSTA, L. M. A. S., SILVA, R. F., FERNANDES, A. F., FONSECA, E. W. N. 2006. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciência e Agrotecnologia*. 30(4):731-738.
- PINTO, C.L.O.; MARTINS, M. L.; VANETT, M. C. D. 2006. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26(23):645-651.
- PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 38:859-965.
- RAVISHANKAR, S. ZHU, L., LAE, B., JOENS, L., FRIEDMAN, M. 2008. Plant-derived compounds inactivate antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni* strains. *Journal of Food Protection*. 71:1145-1149.
- RAVISHANKAR, S. ZHU, L., OLSEN, C. W., MCHUGH, T. H., FRIEDMAN, M. 2009. Edible apple film wraps containing plant antimicrobial inactive food borne pathogens on meat and poultry products. *Journal of Food Science*. 74(8):440-445.
- RAVISHANKAR, S. ZHU, L., OLSEN, C. W., MCHUGH, T. H., FRIEDMAN, M. 2012. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on ham and bologna using pectin-based apple, carrot and hibiscus edible films containing carvacrol and cinnamaldehyde. *Journal of Food Science*. 77(7):377-382.
- RAVISHANKAR, S., ZHU, L., REYNA-GANADOS, J. LAW, B., JOENS, L., FRIEDMAN, M. 2010. Carvacrol and cinnamaldehyde inactivate antibiotic-resistant *Salmonella enterica* in buffer on celery and oysters. *Journal of Food Protection*. 73(2):234-240.
- RHOADES, J. R., DUFFY, G., KOUTSOUMANIS, K. 2009. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and

- Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. Food Microbiology. 26:357-376.
- RIBEIRO JÚNIOR, J. C., ALCÂNTARA, B. K., BELOTI, V. 2016. Spoilage potential of *Paenibacillus* sp. in brazilian raw milk. Ciência Rural. 46(4):637-640.
- RIGGIO, M. P.; LENNON, A.; TAYLOR, D. J.; BENNETT, D. 2011. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. Veterinary Microbiology. 150:394-400.
- ROCOURT, J., BENEMBAREK, P., TOYOFUKU, H., SCHLUNDT, J. 2003. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 35:263-267.
- RODGERS, S. 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. Trends in Food Science and Technology. 12(8):276-284.
- RODRIGUES, L. B., SANTOS, L. R., TAGLIARI, V. Z., RIZZO, N. N., TRENHAGO, G., OLIVEIRA, A. P., GOETZ, F., NASCIMENTO, V. P. 2010. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. Brazilian Journal of Microbiology. 41:1082-1085.
- ROSSI JUNIOR, O. D., VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; BURGER, K. P.; CARDOZO, M. V.; CORTEZ, A. L. L. 2006. Estudo das características microbiológicas do Leite UAT ao longo de seu processamento. Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo. 73(1):27-32.
- RUBAN, P., GAJALAKSHIMI, K. 2012. *In vitro* antibacterial activity of *Hibiscus rosa-sinensis* flower extract against human pathogens. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(5):399-403.
- RUIZ, A., WILLIAMS, S. K., DJERI, N., HINTON JÚNIOR, A., RODRICK, G. E. 2010. Nisin affects the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat turkey ham stored at four degrees Celsius for sixty-three days. Poultry Science. 89:353-358.
- SAKATE, R. I., ARAGON, L. C., RAGHIANTE, F., LANDGRAF, M., FRANCO, B. D. G. M., DESTRO, M. T. 2003. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in

- pré-sliced vacuum-package salami in São Paulo-Brazil. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 53(2):184-187.
- SALLEH, M. N., RUNNIE, I., ROACH, P. D., MOHAMED, S., ABEYWARDENA, M. Y. 2002. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and up-regulation of low-density lipoprotein receptor in HepG2 cells by tropical plant extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:3693-3697.
- SALVATORI, R. U., BESSA, M. C., CARDOSO, M. R. I. 2003. Qualidade sanitária de embutidos coletados no mercado público central de Porto Alegre-RS. *Ciência rural*. 33(4):771-773.
- SAMELIS, J.; BEDIE, G. K.; SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SCANGA, J. A.; SMITH, G. C. 2005. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork Bologna stored at 4°C in vacuum packages. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 38:21-28.
- SAMUEL, C. M., VUGIA, D. J., KOEHLER, K. M., MARCUS, R., DENNEN, V., DAMASKE, B., SHIFERAW, B., HADLER, J., HENAO, O. L., ANGULO, F. J. 2007. Consumption of risky foods among adults at high risk for severe foodborne diseases: room for improved targeted prevention messages. *Journal of Food Safety*. 27:219-232.
- SARTORATTO, A., MACHADO, A. L. M., DELARMELENA, C., FIGUEIRA, G. M., DUARTE, M. C. T., REHDER, V. L. G. 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35:275-280.
- SÁYAGO-AYERDI, S. G., ARRANZ, S., SERRANO, J. 2007. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L) beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(19):7886-7890.
- SCHWERING, M., SONG, J., LOUIE, M., TURNER, R. J., CERI, H. 2013. Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. *Biofouling*. 29:917-928.
- SELBY, T. L., BERZINS, A., GERRAD, D. E., CORVALAN, C. M., GRANT, A. L., LINTON, R. H. 2006. Microbial heat resistance of *Listeria monocytogenes* and the impact on ready-to-eat meat quality after post-package pasteurization. *Meat Science*. 74:425-434.

- SEZER, M. T., GÜLTEKIN, M. S., ERSOY, F. F. 1996. A case of *Kluyvera cryocrescens* peritonitis in a CAPD patient. Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis. 16(3):326-327.
- SILVA, N. K., BASEGGIO, A. M., CIROLINI, A., SILVA, H. S., VIEIRA, C. R. W. 2012. Avaliação microbiológica de presunto cozido fatiado comercializado em Florianópolis, SC através de método convencional e sistema *Petrifilm*®. Gramado: 4º Simpósio de Segurança Alimentar.
- SITOHY, M.; MAHGOUB, S.; OSMAN, A. 2011. Controlling psychrotrophic bacteria in raw buffalo milk preserved at 4 °C with esterified legume proteins. Food Science and Technology. 44:1697-1702.
- SONG, Y.; KATO, N.; LIU, C.; MATSUMIYA, Y.; KATO, H.; WATANABE, K. 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. FEMS Microbiology Letters. 187(2):167-173.
- SORHAUG, T.; STEPHANIAK, L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. Trends in Food Science and Technology. 8:35-41.
- STEENACKERS, H., HERMANS, K., VANDERLEYDEN, J. 2012. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. Food Research International. 45:502-531.
- STEPANOVIC, S., CIRKOVIC, I., RANIN, L., SVABIC-VLAHOVIC, M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. And *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology. 38(5):428-432.
- STEPANOVIĆ S, VUKOVIĆ D, HOLA V, BONAVENTURA G, DJUKIĆ S, CIRKOVIĆ I AND RUZICKA F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing Conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica. 115: 891-899.
- TEH, K. H.; FLINT, S.; PALMER, J.; LINDSAY D.; ANDREWES, P. ; BREMER, P. 2011. Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. International Dairy Journal. 21:742-747.

- TEH, K. H.; Flint, S.; PALMER, J.; ; ANDREWES, P.; BREMER, P.; LINDSAY, D. 2012. Proteolysis produced within biofilms of bacterial isolates from raw milk tankers. *International Journal of Food Microbiology*. 157:28–34.
- THAYER, D. W., BOYD, G. 1992. Gamma ray processing to destroy *Staphylococcus aureus* in mechanically deboned chicken meat. *Journal of Food Science*. 57:848-851.
- TOMPKIN, R. B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food processing environment. *Journal of Food Protection*. 65:709-725.
- UBOLDI-EIROA, M. N. 1990. *Listeria monocytogenes*, characteristics, occurrence and development in food. *Instituto de Tecnologia de Alimentos*. 20(1):13-22.
- UHART, M., MARKS, N., RAVISHANKAR, S. 2006. Effect of spices on growth and survival of *Salmonella* Typhymurium DT 104 in ground beef stored at 4°C and 8°C. *Journal of Food Safety*. 26:115-125.
- VALLIM, D. C., HOFER, C. B., LISBÔA, R. C., BARBOSA, A. V., RUSAK, L. A., REIS, C. M. F., HOFER, E. 2015. Twenty years of *Listeria* in Brazil: occurrence of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* serovars in food samples in Brazil between 1990 and 2012. *BioMed Research International*. 2015:articleID:540204, 8p.
- VELGE, P., CLOECKAERT, A., BARROW, P. 2005. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary Research*. 36(3):267-288.
- WANG, C. J., WANG, J. M., LIN, W. L., CHU, C. Y., CHOU, F. P., TSENG, T. H. 2000. Protective effect of *Hibiscus* anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 38(5):411-416.
- WONG, W. C. PUI, C. F., TUNUNG, R., UBONG, A., NOOR HIDAYAH, M. S., FARINAZLEEN, M. G., NOORLIS, A., CHEAH, Y. K. SOM, R. 2012. Antibioqram pattern among cultures of *Listeria monocytogenes* isolated from frozen burger patties in Malaysia. *Pertanika Journal Tropical Agricultural Science*. 35(4):793-804.



ZHU, M., DU, M., CORDRAY, J., AHN, D. U. 2005. Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 4(2):34-42.

**Livros:**

BELL, C. KYRIAKIDES, A. 2005. **Listeria**: a practical approach to the organism and its control in foods. 2 ed. Ames: Blackwell Publishing Company. 296p.

CARVALHO, I. T. 2010. **Técnico em alimentos**: microbiologia dos alimentos. UFRPE/CODAI. 84p.

COUSIN, M. A.; JAY, J. M.; VASAVADA, P. C. 2001. Psychrotrophic Microorganisms In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium for methods for the Microbiological examination of Foods**. 4 ed. American Public Health Association – APHA, Washington, 676p.

FORREST, J.C., ABERLE, E.D., HEDRICK, H.B., JUDGE, M.D., MERKEL, R.A. 1979. **Fundamentos de ciência de la carne**. Zaragoza: Acribia, 363p.

FORSYTHE, Stephen J. 2013. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed. 602 p.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. 2008. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu. 176p.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B. da.; FRIAS, J. R. G. 2008. **Tecnologia de alimentos princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel. 512p.

GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. 2008. **Hygiene and sanitary surveillance of food**. 3 ed. São Paulo: Manole. 1088p.

JANG, S. S., BIBERSTEIN, E. L.,HIRSH, D. C. 2001. **A diagnostic manual of veterinary clinical bacteriology and mycology**. University of California: Davies. 214p.

JAY, J. M. 2005. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed. 712p.

LAWRIE, R. A . **Ciência da carne**. 2005. Porto Alegre: Artmed editora, 6ª ed., 384p.

MARTINS, E. R., CASTRO, D. M. de, CASTELLANI, D. C., DIAS, J. E. 2000. **Plantas medicinais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 220p.

- MILLER, J. M. 2007. **The microbiology bench companion**. 2. Ed. Washington: ASM press. 120p.
- OLIVEIRA, S. J. de. 2000. **Microbiologia Veterinária: guia bacteriológico prático**. 2. ed. Canoas: ULBRA. 240p.
- ORDOÑEZ, J. A., RODRÍGUEZ, M. I. C., ÁLVAREZ, L. F., SANZ, M. L. G., MINGUILLÓN, G. D. G. F., PERALES, L. H., CORTECERO, M. D. S. 2005. **Tecnologia de alimentos**. v.2 Porto Alegre: Artmed. 280p.
- PARDI, M.C.; SANTOS, I.F. dos; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. 2001. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. 2. Ed. Goiânia: UFG. v. 1. 636p.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. 2005. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artemed. 512p.
- ROÇA, R.O. 2000. **Tecnologia da carne e produtos derivados**. Botucatu: UNESP, 202p.
- SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N. N.; FRANCO, B. D. G. M. 2006. **Atualidades em ciência e tecnologia de carnes**. Editora Varela. São Paulo. 236p.
- SILVA, N. da.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R.A.R. 2010. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimento e água**. São Paulo: Varela. 624p.
- TAVARES, W. 1993. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. São Paulo: Atheneu. 770p.
- TOLDRÁ, F. 2004. **Dry-cured ham meat products**. New York: Wiley-Blackwell. 243p.
- VALSECHI, O. A. 2006. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Universidade Federal de São Carlos. 48p.

#### **Dissertações e Teses:**

- BANDEIRA, M. T. P. S. 2004. **Qualidade Microbiológica da Carne Bovina**. Tese (Especialização em Qualidade de Alimentos) Universidade de Brasília, Brasília.

- HATTORI, A. N., KLAUS, I. C. 2013. **Avaliação microbiológica e higiênico-sanitária em uma panificadora do município de Missal, PR.** Trabalho de conclusão de curso (curso de tecnologia de alimentos) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira.
- MARQUES, S. C. 2008. **Caracterização bioquímica de bactérias psicotróficas de tanques de refrigeração de leite e formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável.** Tese (doutorado em ciência dos alimentos). Universidade Federal de Lavras.
- SÄDE, E. 2011. ***Leuconostoc* spoilage of Refrigerated, packaged foods.** Tese (mestrado). Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland.
- TAVARES, T.M. 2002. **Avaliação microbiológica de hambúrgueres de carne bovina comercializados em sanduicharias tipo “trailers” no centro e na periferia de Goiânia/GO.** Tese (Mestrado em Medicina Tropical). Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- TONELLO, C., ECKERT, R. G. 2013. **Contaminação microbiológica de presuntos comercializados em um estabelecimento comercial certificado e outro não certificado ao programa alimento seguro (PAS).** Tese do Curso de Farmácia, Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel.

#### Internet:

- BARBOSA, J., CAVALHEIRA, A., GIBBS, P., TEIXEIRA, P. 2009. ***Listeria monocytogenes*: biofilm formation ability.** Universidade católica portuguesa. Disponível em: <<http://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/6280/1/Listeria%20monocytogenes%20Biofilm%20%20I%20Ant%20Pept%20Symp%20poster%202009.pdf>> Acesso em: 29/08/16
- BRASIL. Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGRO). 1992. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/laboratorios/lanagros>> Acesso em: 19/04/15.
- BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 09 de 08 de Abril de 2009.** Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/dipoa/IN\\_09%20\\_de\\_8\\_de\\_abril\\_de\\_2009.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/dipoa/IN_09%20_de_8_de_abril_de_2009.pdf)> Acesso em 19/04/15.

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em 19/04/15.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Instrução Normativa nº 20 de 31 de Julho de 2000**. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Almondéga, de Apresuntado, de Fiambre, de Hambúrguer, de Kibe, de Presunto Cozido e de Presunto. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 19/04/15.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa número 62, de 26 de Agosto de 2003**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 22/10/16.
- BRF – **BRASIL FOODS**, 2016. Disponível em: < <https://www.brf-global.com/brasil/qualidade>> Acesso em 06/09/16
- CAUS, S., CZAİKOSKI, K., DALLA SANTA, H. S., ZANETTE, C. M., DALLA SANTA, O .R. 2007. **Qualidade sanitária de presunto cozido fracionado nos pontos de venda**. Universidade Estadual do Centro-oeste. Disponível em: <[www.unicentro.br/pesquisa/anais/proic/2007/pdf/artigo\\_64.pdf](http://www.unicentro.br/pesquisa/anais/proic/2007/pdf/artigo_64.pdf)> Acesso em 06/09/2016
- DIKEMAN, M., DEVINE, C. 2014. **Encyclopedia of meat sciences**. 2 ed. v.1. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?id=vL9dAwAAQBAJ&pg=RA1-PA404&lpg=RA1-PA404&dq=sporotrichum+carnis+ham&source=bl&ots=G6s369cUYe&sig=pk\\_q8Q0SAcfW100y5KVGXrQwENo&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwjmhq-u-JPNAhVGxyYKHcveBHQ6AEIHDAA#v=onepage&q=sporotrichum%20carnis%20ham&f=false](https://books.google.com.br/books?id=vL9dAwAAQBAJ&pg=RA1-PA404&lpg=RA1-PA404&dq=sporotrichum+carnis+ham&source=bl&ots=G6s369cUYe&sig=pk_q8Q0SAcfW100y5KVGXrQwENo&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwjmhq-u-JPNAhVGxyYKHcveBHQ6AEIHDAA#v=onepage&q=sporotrichum%20carnis%20ham&f=false)> Acesso em: 06/08/2016
- DUKE, J. A. 1983. **Hibiscus sabdariffa L**: handbook of energy corps. Disponível em: [[http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/Hibiscus\\_sabdariffa.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Hibiscus_sabdariffa.html)] Acesso em 12/05/16
- HEALTH PROTECTION AGENCY. 2009. **Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods**. London: Health Protection Agency. Disponível em:

<[https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/363146/Guidelines\\_for\\_assessing\\_the\\_microbiological\\_safety\\_of\\_ready-to-eat\\_foods\\_on\\_the\\_market.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/363146/Guidelines_for_assessing_the_microbiological_safety_of_ready-to-eat_foods_on_the_market.pdf)> Acesso em 06/09/2016

SOUZA, C. M. O. C. S. 2015. **Rotulagem de alimentos fatiados no local e validade de produtos abertos.** Disponível em <<http://alimentacaolegal.com/rotulagem-x-validade.html>> Acesso em 19/04/15

## 8. ANEXOS

Conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e o Ambiente (PPGMAA), é exigido que se apresente no mínimo um artigo para submissão e obtenção do grau de mestre.

O artigo abaixo está de acordo com as normas de submissão exigidas pela revista *Meat Science*, revista escolhida para a publicação do mesmo.

### **Presence of psychrotrophic bacteria in sliced cooked ham and evaluation of the potential to deterioration and adhesion for these microorganisms**

Stéfano Caon<sup>1</sup>, Ana Paula Povaluk<sup>2</sup> and Amanda de Souza da Motta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup>Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina, Brazil

Corresponding author: s\_caon@hotmail.com

#### **Abstract**

One of the major trends today are the products ready-to-eat, as cooked ham. *Listeria monocytogenes* is the pathogen that has been associated as the most commonly found in this kind of food. This study aimed to evaluate the presence of *Listeria monocytogenes* and psychrotrophic microorganisms in sliced ham sold in public market of Porto Alegre/RS and check the enzymatic activity, the production capacity of biofilm and adhesion ability of some of these microorganisms' colonies. The psychrotrophic count showed colony forming units (CFU) ranging from  $2.1 \times 10^4$  to  $8.1 \times 10^5$  CFU/mL. *Listeria* spp. Was detected in 8 samples and showed 100% of presence, which 50% were *L. monocytogenes* with serotypes 1/2a, 1/2b and 1/2c. 134 psychrotrophics were isolated and 71 showed proteolytic activity, 58 lipolytic activity and 12 showed production of exopolysaccharide. Two bacteria were selected for molecular identification and were identified as *Kluyvera intermedia* and *Carnobacterium maltaromaticum* Four bacteria were subjected to biofilm production and stainless steel adhesion resulting as weak producer and positive to adhesion.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, psychrotrophics bacteria, ham, food security

## 1. Introduction

Cooked meat products are economically important and the shelf life of these products is the interest of food industry. These properties could promote the development of pathogenic and deteriorating microorganisms, leading these foods to problems of deterioration and impairment of microbiological safety (Mottin et al., 2006; Mehrabian and Jaberi, 2007). As properties, this product present minimum of 14% for crude protein, pH between 5.9 and 6.1 and a water activity ranging from 0.91 to 0.97, in consequence, the product can be susceptible to contamination by microorganisms (Brazil, 2000; Franco and Landgraf, 2008).

Historically *Listeria monocytogenes* is the pathogen that has been associated as the most commonly found in ready-to-eat foods, mainly due to its ubiquitous nature and to be able to resist the eradication in the food processing environment (Carpentier and Cerf, 2011). It's a psychrotrophic bacteria and is able to grow at low temperatures (Rhoades, Duffy and Koutsoumanis, 2009; Carvalho, 2010). This capability makes *L. monocytogenes* an important pathogen, particularly in foods that were kept under refrigeration, highlighting the ready-to-eat food (Kathariou, 2002).

The psychrotrophic bacteria are known to have the ability to grow at refrigerator temperatures, regardless of the optimum temperature for their growth. The metabolism predominantly in this kind of bacteria is proteolytic and lipolytic (Valsechi, 2006; Carvalho, 2010) and these bacteria produce alterations in the organoleptic properties of the products. (Carvalho, 2010; Säde, 2011). There is no legislation that standardize or put a maximum limit on the total count of psychrotrophic microorganisms. According to Champagne (1994), psychrotrophic counts above 6,0 Log<sub>10</sub> (10<sup>6</sup> CFU/mL) make the organoleptic changes noticeable. According to the Health Protection Agency (United Kingdom, 2009) a satisfactory total counts should be below 10<sup>4</sup> CFU/g for cooked meat products. Then the presence of psychrotrophic is undesirable once it can produce lipolytic and proteolytic enzymes thermoresistant, which maintain their viable degrading activity even after thermal treatment and thereby changing the appearance and properties of the food in consequences of bacteria's metabolism (Rossi Jr et al., 2006; Food Ingredients Brazil, 2011).

Biofilms are a major form of microbial life in which one or more species of bacteria form densely populated communities, typically enclosed in a matrix of a polymer that is secreted (Hall-Stoodley and Stoodley, 2009 ; Abee et al., 2011;. Steenackers, Hermans and

Vanderleyden, 2012; Hobley, Harkins and Macphee, 2015) which commonly consists of DNA, lipids, exopolysaccharides and extracellular proteins (Branda et al., 2005; Flemming and Wingender, 2010). The ubiquity of biofilms is related to the colonizing ability of microorganisms in biotic or abiotic surfaces, like the surfaces present in an industrial lines, since the bacteria who live in biofilms are more able to tolerate physical and chemical damage when compared to planktonic cells (Hall-Stoodley, Costerton and Stoodley, 2004; Ciofu et al., 2015). Among the sources of food contamination there are the failures in the cleaning processes of surfaces and equipment, favoring the adhesion and formation of biofilm, a fact that has greater concern when it comes to food stored for long periods at refrigeration temperature. Bacteria in biofilms can exhibit the ability to deterioration of food for the production of heat-resistant enzymes (Marques, 2008).

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Collection of sliced cooked ham samples**

Eighth samples of sliced cooked ham were collected from 4 stores of the Public Market in Porto Alegre, Rio Grande do Sul (Store A, Store B, Store C and Store D) for research psychrotrophic bacteria and *Listeria monocytogenes*. It is carried out from May to June of 2015.

### **2.2 Psychrotrophic bacteria count**

The psychrotrophic bacteria count was performed according to the methodology indicated by the National Agricultural Laboratory (LANAGRO), of the Ministry of Agriculture Food Supply (Brazil, 1992). 25 g of sliced cooled ham were deposited in a sterile bag and added to 225 mL of Buffered Peptone Water (BPW - Merck®) and mixed for 60 seconds. Serial dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$ ) in 0.85% saline solution were prepared. The dilutions were inoculated in culture medium Plate Count Agar (PCA - Kasvi®). The plates were incubated at refrigeration temperature (4 to 8°C) for 10 days. After this step, the plates were selected containing between 25 to 250 colonies to count, and the results were expressed as colony forming units per milliliter (CFU/mL).

### **2.3 *Listeria monocytogenes* research**

The isolation of *Listeria monocytogenes* followed the methodology described by Silva et al. (2010) using the ISO 11290-1:1996 amendment 1:2004. The biochemical identification of the



isolates, was performed by sugar fermentation tests (rhamnose, xylose and mannitol), CAMP test (blood agar - Himmedia®) and motility test (Himedia®). Cultures identified as *Listeria monocytogenes* were sent to Bacterial Zoonoses Laboratory of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) for serotyping.

#### **2.4 Evaluation of proteolytic, lipolytic and exopolysaccharide production**

The assays of the expression of extracellular enzymes were performed according Ruaro et al. (2013), with some modifications. For proteolytic activity, bacterial cultures were inoculated by chopped in milk agar (5 g L<sup>-1</sup> meat peptone, 3 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 12 g L<sup>-1</sup> agar, 10 % skim bovine milk) and incubated at 30 °C for 48 hours. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 was used as positive control. For lipolytic activity, the psychrotrophic bacterial isolates were inoculated in culture medium Tributyrin Agar (Sigma, EUA) and incubated at temperature of 25 °C for 48 hours. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was used as positive control. In both tests, the appearance of clear zones around the colony represented enzymatic activity and the results were expressed in millimeters (mm). The production of exopolysaccharides (EPS) was determined by culturing in congo red agar (CRA) using 0.8 g of congo red dye (Dinâmica®), to 1 L to Brain hearth infusion (BHI) agar (Himedia®) and 50 g of sucrose. The production of rough and black colonies features the EPS production, differentiating not producing crops EPS, which showed smooth and red colonies (Freeman et al., 1989). *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 strain was used as a positive control. All plates were incubated at 30 °C for 48 hours.

#### **2.5 Selection and identification of psychrotrophic bacteria**

Bacteria that grew on refrigeration temperature, were considered psychrotrophic and subsequently selected. These colonies were subcultured on BHI agar medium and incubated at 25 °C for 48 hours. The molecular identification followed the methodology by Riggio et al. (2011), Kusumaningrum et al. (2003) and Song et al. (2000). Pure colonies had 500 nucleotides of DNA from the 16S region extracted following the protocol of PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories®). After visualization of DNA bands on agarose gel using a transilluminator, the thermal cycler was programmed to perform the PCR reaction to amplify the DNA. Soon the DNA were purified using a commercial kit ExoSAP-IT® (Affimetrix-USB®) and then was sent to Ludwig Biotec Laboratory to provide sequencing service.

## 2.6 Evaluation of biofilm formation

For this test were selected two psychrotrophic bacteria and two strains of *Listeria monocytogenes*. To evaluate the biofilm ability 2 medium were tested. The 96-well plates were filled with 180  $\mu$ L of Tryptic Soy Broth (TSB - Himedia®) supplemented with 1.0 % of meat extract and 0.75 % glucose (Dinâmica®) or 180  $\mu$ L of TSB supplemented with 1.0 % meat extract and no glucose was add. The suspensions of cultures were adjusted to a 0.5 McFarland scale, and 20  $\mu$ L were inoculated into each well. For the negative control, was used only TSB with glucose or TSB with meat extract. For the positive control was used *Staphylococcus epidermidis* ATCC 25923, which is strong biofilm-forming. The 96-well plates were sealed and incubated at 25 °C for 48 hours. After this, the wells were washed 3 times with 200  $\mu$ L of sterile 0.85 % saline solution. The fixing of the bacteria was carried out with 200  $\mu$ L of methanol (VETEC) for 20 minutes, then the microplates were maintained inverted until drying. Then the samples were stained with 200  $\mu$ L of crystal violet 0.5 % (Dinâmica®) for 15 minutes, followed by washing with distilled water. After this step, the colored button attached to the bottom of the wells, were resuspended with 150  $\mu$ L of ethanol 95 % (VETEC). The microplate was kept standing for 30 minutes and then the quantification of biofilms was performed through optical density (OD) of wells using a spectrophotometer at wavelength of 450 nm (Brand: Anthos 2010 Type 17 550 S. N° 17 550 4894). The isolates were classified as non-formers, weak, moderate or strong formers of biofilm (Stepanovic et al., 2007). All isolates were tested at least eight times.

## 2.7 Evaluation of adhesion of psychrotrophic bacteria on stainless steel surfaces

The adhesion assay was performed using stainless steel (AISI 304) with surfaces of 1 cm<sup>2</sup> according to the Nörnberg et al (2011) and Bayoumi et al (2012), with modifications. For the preparation of the pre-inoculum, selected isolates were subjected to growth in TSB (Himedia®) with 1 % of meat extract (Himedia®). The volume of 1mL pre-inoculum culture with an initial cell concentration equal to 0.5 McFarland scale was inoculated into 4 mL of TSB broth (Himedia®) supplemented with 1 % meat extract (Himedia®) in 50 mL Falcon® tubes, each containing a sterile stainless steel that were incubated at 25 °C for 24 hours. For total bacterial count procedure, the stainless steels were removed with a tweezer and then washed by immersion in sterile distilled water for three consecutive times to remove weakly adherent cells. After rinsing the samples were transferred to 10 mL of saline solution 0.85 %

and were subjected to an ultrasonic bath (Ultrasonic, USC 700, Inique) with frequency of 40 kHz for 10 minutes. After that serial dilutions were performed and plated in plate count agar (Kasvi®), were incubated at 25 °C for 24 hours. The colonies were counted and the quantification was expressed in colony forming units per square centimeter (CFU/cm<sup>2</sup>).

## 2.8 Statistical Analysis

The statistical analysis were conducted in SPSS 18.0.3 program. It used the ANOVA test to verify the distribution's normality of the data and applied Tukey's test to analyzed the significance of the data ( $p > 0,05$ ).

## 3. Results

### 3.1 Count of psychotropic bacteria

The psychrotrophic bacteria count ranged from 4.32 log<sub>10</sub>/mL (2.1 x10<sup>4</sup> CFU/mL) to 5.91 log<sub>10</sub>/mL (8.1 x10<sup>5</sup> CFU/mL). The values found for the scores were considered high since that are working with a highly perishable and ready to eat foods. The results can be seen in Table 1.

**Table 1.** Result of psychrotrophic bacteria counts from sliced cooked ham.

	Psychrotrophic (CFU/mL)	Psychrotrophic (Log <sub>10</sub> /mL)	Standard Deviation
<b>Store A</b>	8.1x10 <sup>5</sup>	5.91	1.012
<b>Store B</b>	2.1x10 <sup>4</sup>	4.32	0.070
<b>Store C</b>	3.1x10 <sup>5</sup>	5.50	0.455
<b>Store D</b>	3.8x10 <sup>5</sup>	5.58	1.768

### 3.2 *Listeria monocytogenes* research

From the 8 ham samples collected in 4 Stores of the public market in Porto Alegre, 10 colonies of *Listeria* sp. were isolated (3 to Store A, 2 to Store B, 2 to Store C and 3 to Store D); of these eight colonies were biochemically identified as *L. monocytogenes*. These were forwarded to FIOCRUZ for serotyping and 5 of these colonies were confirmed as *L. monocytogenes*: 1 was 1/2a serotype (store D), 2 of 1/2b serotype (stores A and C) and 2 of 1/2c serotype (stores B and D). The other *Listeria* sp. colonies were identified as *L. innocua* (3), *L. murray* (1) and *L. grayi* (1) as shown in Table 2.

**Table 2.** *Listeria* sp. species and serotypes presents in sliced cooked ham

Store A (3)	Store B (2)	Store C (2)	Store D (3)
<i>L. m.</i> 1/2b (1)	<i>L. m.</i> 1/2c (1)	<i>L. m.</i> 1/2b (1)	<i>L. m.</i> 1/2a (1)
<i>L. innocua</i> (2)	<i>L. murrayi</i> (1)	<i>L. grayi</i> (1)	<i>L. m.</i> 1/2c (1)
			<i>L. innocua</i> (1)

*L. m.*: *Listeria monocytogenes*

### 3.3 Evaluation of proteolytic and lipolytic activity and exopolysaccharide production

A total of 134 psychrotrophic microorganisms were selected and 71 of them showed proteolytic activity. Of Store A were tested 13 psychrotrophic bacteria, with minimum and maximum average values of 3.82 to 14.20 mm. In Store B, 24 bacteria were tested, with minimum and maximum values of 2.8 to 13.98 mm. In the Store C for 20 psychrotrophic bacteria tested, the values of 3.09 to 14,62 mm were observed and Store D, the 14 isolates tested showed values ranging from 2.28 to 10.80 mm. The positive control *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 showed average results of 7.32 mm.

The 71 psychrotrophic bacteria that showed proteolytic activity were subjected to evaluation of lipase production in tributyrin agar. It was observed that 58 bacteria had the lipolytic profile. For Stores the results, minimum and maximum diameters of halos measures were: Store A, were tested 9 bacteria, with values of 2.85 to 5.35 mm; in Store B were 13 bacteria tested, with values of 2.80 to 9.80 mm, in Store C for 13 bacteria tested, the values were 1.55 to 10.60 mm and in Store D, for 10 bacteria tested, the values were 1.80 to 10.75 mm. To the positive control *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 the value was 7.41 mm. For the evaluation of production of exopolysaccharide (EPS) the 71 psychrotrophic bacteria were spread in red congo agar (RCA) and only 12 microorganisms showed this type of property. None of psychrotrophic isolates for Store D were presented the exopolysaccharide production property. With this test, it was observed that only 4 isolated of psychrotrophic microorganisms presented simultaneously proteolytic and lipolytic activity and exopolysaccharide production.

### 3.4 Identification of psychrotrophic bacteria of sliced cooked ham

Were selected 2 isolates for 12 that shown production of exopolysaccharides to identify. These isolates codes were shown in Table 3 with the results of extracellular enzymes. For molecular identification were selected only 2 cultures (P4M and P5D) which showed positive

results for all tests done. The analysis was carried out by Ludwig Biotec and through the Chromas program and the GenBank website. These microorganisms were identified molecularly with 99 % of similarity with *Kluyvera intermedia* NBRC 102594 and 98 % of similarity with *Carnobacterium maltaromaticum* DSM 20342.

**Table 3.** Results of preliminary biochemical identification, production of hydrolytic enzymes and production of exopolysaccharide by psychrotrophic bacteria isolated from sliced baked ham.

Isolated Code	Store	Proteolytic Enzyme	Lipolytic Enzyme	Exopolissacarides production
P5D	C	+	+	+
P1B	C	+	+	+
P1O	C	+	-	+
P4M	B	+	+	+
P3B	A	+	-	+
P7J	A	+	-	+
P5F	C	+	-	+
P5H	C	+	+	+
P5N	C	+	-	+
P7K	A	+	-	+
P7T	A	+	-	+
P4E	B	+	-	+

i: isolated code

### 3.5 Biofilm formation by selected bacterial isolates

To these tests were selected 4 bacteria - *Kluyvera* sp., *Carnobacterium* sp. and 2 *Listeria monocytogenes* (serotype 1/2b (store A) and serotype 1/2c (store B) – and all of them showed weak biofilm production in presence and absence of glucose. The culture *S. epidermidis* ATCC 35984 was showed as strong biofilm formers in all tested conditions.

### 3.6 Adherence of psychrotrophic strains in stainless steel AISI 304 coupons

This test aimed at assessing the ability of cells to adhere on stainless steel AISI 304 surfaces at the temperature of 25 °C. The results of this test are shown in Table 4. The count of planktonic cells of all strains ranged from 8.00 to 8.505 log CFU /cm<sup>2</sup> and 8.278 log CFU /cm<sup>2</sup> to positive control *S. epidermidis* ATCC 35984, which is considered strong biofilm former. The count of bacterial cells adhered of *L. monocytogenes* 1/2b, *L. monocytogenes* 1/2c

and *Carnobacterium* sp. was similar, with values of 4,171, 4,406 and 4,447, respectively at 24 hours. The higher count cell adhered on the surface of stainless steel AISI 304 was found in *Kluyvera* sp. in 24 hours of incubation, showing a difference of the counts of other bacteria. The results showed that the selected microorganisms had adherence in stainless steel. All microorganisms showed approximated values in planktonic cells.

**Table 4.** Values of the counts of planktonic bacteria and attached bacteria in stainless steel after 24 hours of incubation and statistic difference between then

	Planktonic Bacteria	Attached Bacteria
<i>L. monocytogenes</i> 1/2b	8.290 a	4.171 b
<i>L. monocytogenes</i> 1/2c	8.000 a	4.406 b
<i>Kluyvera</i> sp.	8.505 a	5.267 c
<i>Carnobacterium</i> sp.	8.469 a	4.447 b
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	8.278 a	4.389 b

Data expressed in  $\text{Log}_{10}/\text{cm}^2$ . Equal letters represent equal statistically values in the variance analysis (ANOVA) and Tukey's test ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Discussion

There is no legislation that standardizes a maximum limit on the total count of psychrotrophic microorganisms. The values obtained in counts of these micro-organisms were quite high, in accordance with Champagne (1994) that says that psychrotrophic counts above  $6.0 \log_{10}$  ( $10^6$  CFU/mL) become perceptible organoleptic changes in food. According to the Health Protection Agency (United Kingdom, 2009), a satisfactory total count should be below  $10^4$  CFU/g for cooked meat products.

Menezes, Coelho and Costa (2010) made an analysis in sliced cooked ham and the values of psychrotrophic counts varied from  $1.0 \times 10^1$  to  $4.2 \times 10^8$  CFU/g. Altunatmaz, Issa and Aydin (2012) conducted a study of the microbiological quality of ready-to-eat food and obtained psychrotrophic count values between 40.0 CFU/m<sup>3</sup> to 82.3 CFU/m<sup>3</sup>. The values generated in this study, suggest the need to update the brazilian legislation, creating a tolerable limit of these microorganisms in food, since according to the Health Protection Agency (UK, 2009). With the present results it can be seen that the sliced cooked hams are considered unsuitable for consumption according to the RDC 12 (2001). This legislation establishes the absence of *Listeria monocytogenes* in 25 g samples. In the collections carried out in this work, it was possible to find bacteria of the genus *Listeria* spp. as follows: 50 % (5/10) of *Listeria monocytogenes*; 30 % (3/10) of *L. innocua*; 10% (1/10) of *L. grayi* and 10 % (1/10) of *L.*

*murray*. Whereas the contamination source of this bacterium group is the same, the presence of any species of *Listeria* can refer to the possibility of the presence of pathogenic specie, *Listeria monocytogenes*, in food sample.

Vallim et al. (2015) analyzed the occurrence of *Listeria* spp. in food from 12 Brazilian states, from 1990 to 2012. Was found that 81.7 % of the isolates were meat origin, among them, 24.3 % were processed meats (cooked, cured or smoked). In this period could observe that *L. monocytogenes*, has greater geographic distribution in the states of São Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso and Paraíba, a fact that converges with the present study, which was conducted in the state of Rio Grande do Sul. The distribution of *L. monocytogenes* serotypes, in Brazil during this period were as follows: 4b (29.0 %); 1/2a (28.2 %); 1/2b (20.7 %); 1/2c (16.8 %); serotypes 3a, 3b, 3c, 4c, 4e and non-typeable strains gave values less than 1 % each. In another study conducted in southern Brazil by Haubert (2015), the occurrence of serotypes of *L. monocytogenes* originating from food and food industry was detected, that the serotype 1/2b (42 %) was the most prevalent, also detected the serotypes 4b (26 %), 1/2c (22 %) and 1/2a (10 %), the same detected in this work. Camargo et al. (2016) made the serotyping of *L. monocytogenes* isolated from clinical samples, environmental and brazilian foods, obtaining the following results: 1/2c (53 %); 4b (22 %); 1/2b (16 %) and 1/2a (9 %). Sakate et al. (2003) investigated the presence of *L. monocytogenes* in different sliced salamis types and brands and detected this bacteria in 6.7 % (3/45) containing serotypes 1/2a and 1/2b. Martins (2011) found in sliced cooked ham and salami the following serotypes: 4b (37.5 %); 1/2b (25 %); 3b (35 %) and 1/2c (12.5 %). With these data, it can be concluded that the most common serotypes found in brazilian isolates of *L. monocytogenes* are 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b with the incidence varying between them, probably according to the brazilian region studied, one serotype predominates over the others, however can observe the continued presence of these 4 serotypes in literary studies like converging with the predominantly of serotypes 1/2b and 1/2c as found in the present study.

Being an enteric bacterium, the presence of *Kluyvera* sp. comes to indicate a possible fecal contamination of food that was analyzed and still this microorganism can be an opportunistic bacterium, which will cause some injury to health (Sarria, Vidal and Kimbrough III, 2001). Österblad et al. (1999) identified this microorganism contaminating vegetables. Farmer et al. (1981) isolated *Kluyvera ascorbata* and *Kluyvera cryocrescens* of clinical samples, water, soil and food. Duarte et al. (2002) identified a *Kluyvera* sp. from hospital samples; Sezer et al. (1996) identified a *Kluyvera cryocrescens* from a clinical sample; Ahmed, Das and Geroge

(2015) identified 11 bacteria in semen of poultry as *Kluyvera ascorbata* and Bastos et al. (2008) isolated a *Kluyvera* sp. clinical sample of animal origin.

According to the Health Protection Agency (UK, 2009), the microorganisms normally found in meat product comprises lactic acid bacteria such as *Lactobacillus* sp. and *Carnobacterium* sp. which do not cause damage to consumers' health, but with amounts close to  $10^9$  CFU/g occurs deterioration of food in consequence to the production of lactic acid. The amount of microorganisms that may be transported at the time of slicing the cooked ham piece is an important point to consider. The placement of pathogenic or deteriorating environmental bacteria will compromise the safety and shelf life of the product. Psychrotrophic bacteria can drastically reduce the quality and durability of food, since proteolytic and lipolytic activities are associated with deterioration of the product. A total of 53 % (71/134) of psychrotrophs presented proteolytic capacity and 43 % (58/134) lipase activity, observing that 43 % presented lipolytic and proteolytic activity simultaneously. Ribeiro Junior, Alcantara and Beloti (2016) investigated the deterioration potential spore-forming bacteria in brazilian raw milk and 29.2 % (40/137) showed proteolytic and/or lipolytic activity. Carpiné et al. (2010) conducted a study in handmade salamis where proteolytic and lipolytic activity of lactic acid bacteria, were present. Kenneally, Leushner and Arendt (1998) tested starter cultures used in meat, and 60.8 % showed lipolytic activity on tributyrin agar. Papamanoli et al. (2003) evaluated the ability of proteolytic lactic acid bacteria present in Greek fermented sausage and all of the isolates of *Lactobacillus plantarum* (7) and *L. curvatus* (24) showed that activity against in milk agar. Alapont, Martínez-Culebras and Lopez (2014) determined the lipolytic and proteolytic activity of fungal microbiota present in cured ham and finding that 94.5 % showed lipolytic activity (70/74) and 52.7 % (39/74) showed activity proteolytic. These studies show a variation in the percentage of microorganisms with proteolytic and lipolytic activity. It can be concluded that with these data showed in the studies previously mentioned and in the actual study, this variation may be for type of food analyzed, for the present microbiota, for the colonies that were selected or for the region that the study was conducted. Kayser et al. (2013) found the production of exopolysaccharide by *S. epidermidis* in red congo agar. Hassan et al. (2011) conducted the evaluation of different broth, including the CRA, comparing the production of exopolysaccharide by clinical isolates also using *S. epidermidis* ATCC 35984 as positive control. Mathur et al. (2006) led to the detection of exopolysaccharide formation by *Staphylococcus* spp. derived from clinical isolates. Melo et al. (2013) found the exopolysaccharide's production in CRA by *S. aureus* that were causing



bovine mastitis. These previously studies showed a similar result with the present study. This test of the CRA is important because through it can be projected that the cultures exopolysaccharide producers also show chances of being biofilm producers.

Rodrigues et al. (2010) carried out the same method for quantification of the biofilm produced by *Listeria* sp. isolated from poultry slaughterhouse and obtained 4 isolates that do not produce biofilms, 1 weak producer and 2 moderate producers in the presence of 0.5% glucose; However, with the addition of 1% glucose 1 isolate obtained non-producer, 5 weak producers and 1 moderate producer; and without addition of glucose obtained 1 isolated not producer biofilms, 3 weak producers and 3 moderate producers of biofilm. Stepanovic et al. (2004) performed this technique and obtained 5 *L. monocytogenes* as strong producers of biofilm, 1 as moderate producer and 1 as weak producer in TSB broth. Barbosa et al. (2009) determined the capacity of 258 *Listeria monocytogenes* isolated from food to produce biofilm and 2 isolated do not producers biofilm, 177 weak producers and 79 as moderate forming biofilms. Doijad et al. (2015) determined the quantification of biofilms produced by *L. monocytogenes*, obtaining 63.25 % of isolated as weak producers, 27.55 % of moderate producers and 9 as strong producers biofilms. Barbosa et al. (2013) studied the production of *L. monocytogenes* biofilms from food and clinical samples, and 54 % of were weak producers, approximately 40% of moderate producers, less than 5 % of strong biofilm formers at 37 °C from food samples and 70 % of weak producers, approximately 25 % of moderate producers, and less than 5 % by strong producers from clinical origin.

In this study, with or without addition of glucose did not change the classification of *Listeria monocytogenes*, *Kluyvera* sp. and *Carnobacterium* sp., front of biofilm production, keeping them as weak producers in both cases. This result shows a potential of these microorganisms in the formation of structures such as biofilms, together with the other production data of hydrolytic enzymes. Considering the possibility of these isolates being in high quantities, the compromise of innocuity and microbiological quality will be perceived. The biofilm production capacity and the stainless steel adhesion are disturbing factors in the food industry, since this type of material is commonly used in large scale. The adhesion association with biofilm production makes it difficult removal and/or elimination of microorganisms in industry, since the biofilm confers greater protection for microorganisms which are adhered to and forming biofilms (Davies, 2003; Ciofu et al., 2015).

Bae et al. (2012) determined the ability of adhesion of *L. monocytogenes* to stainless steel surfaces and obtained at 25 °C a total of 3 Log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup> of adhered cells on stainless steel

bodies. Casarin et al. (2014) also demonstrated *L. monocytogenes* adhesiveness in stainless steel obtaining values around  $3 \log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup>. In this study both *Listeria monocytogenes* were close to  $4 \log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup>. The adhesion of *Kluyvera* sp. *Carnobacterium* sp., in stainless steel coupons, was also observed. Stepanovic et al. (2004) evaluated the adhesion of *L. monocytogenes* in plastic surfaces and the numbers of adhered cells were ranged from 2 to  $3 \log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup>. Similar levels of adherence by this microorganism were observed on glass surfaces, in the study by Chae and Schraft (2000). The study by Oliveira et al. (2010) shows that a total of  $4.89 \log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup> of *L. monocytogenes* cells were able to adhere to stainless steel after 3 hours of contact and  $4.08 \log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup> after 48 hours. These values show closer to those found in the present study, coming to converge. The results of this work indicate a concern with the quality and safety of the sliced baked goods collected in the Public Market of Porto Alegre. With the studies conducted, it was possible to identify potential for deterioration and adherence by the studied cultures.

## 5. Conclusion

The results of this study show that many psychrotrophic bacterial isolated from ham have the potential to produce proteolytic, lipolytic and also adhesion and biofilm formation. Thus, all these combined factors and presented by psychrotrophic bacterial represent a source of contamination and deterioration to food, causing problems for the economy and public health.

## 6. Acknowledgements

The authors acknowledge the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and others laboratories that supported this research.

## 7. References

- Abee, T.; Kovacs, A. T.; Kuipers, O. P.; Van Der Veen, S. 2011. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 22:172–179.
- Ahmed, K., Das, K. K., George, S. 2015. Bacterial flora of poultry semen and their antibiotic sensitivity pattern. *International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture*. 1(7): 39:41

- Alapont, C., Martínez-Culebras, P. V., López-Mendoza, M. C. 2014. Determination of lipolytic and proteolytic activities of microflora isolated from dry-cured teruel ham. *Journal of Food and Science Technology*. 52(8):5250:5256.
- Altunatmaz, S. S., Issa, G., Aydin, A. 2012. Detection of airborne psychrotrophic bacteria and fungi in food storage refrigerators. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012:1436:1443
- Bae, Y. M., Baek, S. Y., Lee, S. Y. 2012. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*. (153):465-473.
- Barbosa, J., Borges, S., Camilo, R., Magalhães, R., Ferreira, V., Santos, I., Silva, J., Almeida, G., Teixeira, P. 2013. Biofilm formation among clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Microbiology*. 2013:1-6.
- Barbosa, J., Cavaleira, A., Gibbs, P., Teixeira, P. 2009. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation ability. Universidade católica portuguesa. Available at: <<http://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/6280/1/Listeria%20monocytogenes%20Biofilm%20%201%20Ant%20Pept%20Symp%20poster%202009.pdf>>
- Bastos, H. M., Lopes, L. F. L., Gattamorta, M. A., Matushima, E. R. 2008. Prevalence of *Enterobacteria* in *Bothrops jararaca* in São Paulo state: microbiological survey and antimicrobial resistance standards. *Acta Scientiarum Biological Sciences*. 30(3):321-326.
- Bayoumi, M. A., Kamal, R. M., Abd El Aal, S. F., Awad, E. I. 2012. Assessment of regulatory sanitization process in Egyptian dairy plants in regard to the adherence of some food-borne pathogens and their biofilms. *International Journal of Food Microbiology*. 158 (3):225-231.
- Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*. 13:20-26.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. ° 12 de 02 de Janeiro de 2001. Available at: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>.
- Brasil. Ministério da agricultura. 1992. Available at <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>.
- Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 20 de 31 de Julho de 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Almôndega, de Apresuntado,

- de Fiambre, de Hambúrguer, de Kibe, de Presunto Cozido e de Presunto. Available at: <<http://www.agricultura.gov.br>>
- Camargo, A. C., Vallim, D. C., Hofer, E., Nero, L. A. 2016. Molecular serogrouping of *Listeria monocytogenes* from Brazil using PCR. *Journal of Food Protection*. 79(1):144-147.
- Carpentier, B., Cerf, O. 2011. Review – persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*. 145:1-8.
- Carpiné, D., Dagostin, J. L. A., Dalla Santa, H. S., Alvarez, D. C., Terra, N. N., Dalla Santa, O. R. 2010. Atividade proteolítica e lipolítica de bactérias lácticas isoladas de salames artesanais. *Ambiência Guarapuava*. 6(1):125-132.
- Carvalho, I. T. 2010. Técnico em alimentos: microbiologia dos alimentos. UFRPE/CODAI. 84p.
- Casarin, L. S., Brandelli, A., Casarin, F. O., Soave, P. A., Wanke, C. H., Tondo, E. C. 2014. Adhesion of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on stainless steel welds. *International Journal of Food Microbiology*. 191:103-108.
- Chae, M. S., Schraft, H. 2000. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 62:103-111.
- Champagne, C. P. ; Laing, R. R.; Roy, D.; Mafu, A. A. ; Griffiths, M. W. 1994. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 34(1):1-30.
- Ciofu, O., Tolker-Nielsen, T., Jensen, P. O., Wang, H., Holby, N. 2015. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 85:7-23.
- Davies, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews in Drug Discovery*. 2:114-122.
- Doijad, S. P., Barbuddhe, S. B., Garg, S., Paharkar, K. V., Kalorey, D. R., Kurkure, N. V., Rawool, D. B., Chakraborty, T. 2015. Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. *PLoS ONE*. 10(9):e0137046
- Duarte, A., Faria, N., Conceição, T., Correia, M., Lito, L. M., Cristino, J. M., Salgado, M. J., Tenreiro, R. 2002. Identification of TEM-10  $\beta$ -lactamase in *Kluyvera* sp. and

- other *Enterobacteriaceae* at a portuguese hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(12):4041-4042.
- Farmer, J. J., Fanning, G. R., Huntley-Carter, G. P., Barry Holmes, F. W., Hickman, F. W., Richard, C., Brenner, D. J. 1981. *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family *Enterobacteriaceae*: identification of *Kluyvera ascorbata* sp. nov. and *Kluyvera cryocrescens* sp. nov. in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 13(5):919-933.
- Flemming, H. C., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 8:623-633.
- Food Ingredients Brasil. 2011. Shelf life: uma pequena introdução. *Revista Food Ingredients Brasil*. 18:67-73.
- Franco, B. D. G. De M.; Landgraf, M. 2008. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu. 176p.
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., Keane, C. T. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative *Staphylococci*. *Journal of Clinical Pathology*. 42(8):872-874.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2:95-108.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiology*. 11:1034-1043.
- Hassan, A. Usman, J., Kaleen, F., Omair, M., Khalid, A., Iqbal, M. 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 15(4):305-311.
- Haubert, L., Mendonça, M., Lopes, G. V., Cardoso, M. R. I., Silva, W. P. 2015. *Listeria monocytogenes* isolates from food and food environment harbouring *tetM* and *ermB* resistance genes. *Letters in Applied Microbiology*. 62:23-29.
- Health Protection Agency. 2009. Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods. London: Health Protection Agency. Available at: <[https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/363146/Guidelines\\_for\\_assessing\\_the\\_microbiological\\_safety\\_of\\_ready-to-eat\\_foods\\_on\\_the\\_market.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/363146/Guidelines_for_assessing_the_microbiological_safety_of_ready-to-eat_foods_on_the_market.pdf)>

- Hobley, L., Harkins, C., Macphee, C. E. 2015. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiology Reviews*. 39:649-669.
- Issa, Z. M., Mustakim, M., Mohamed, S. A. S., Muda, N. M., Radu, S., Yen, L. H. 2011. Antibiofilm profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering*. 7:133:137.
- Jang, S. S., Biberstein, E. L., Hirsh, D. C. 2001. *A diagnostic manual of veterinary clinical bacteriology and mycology*. University of California: Davies. 214p.
- Kathariou, S. 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection*. 65(11):1811-1829.
- Kayser, T. D. L., Pereira, E. M., Santos, K. R. N., Maciel, E. L. N., Shuenck, R. P., Nunes, A. P. F. 2013. Modification of the congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 75:235-239.
- Kenneally, P. M., Leuschner, R. G., Arendt, E. K. 1998. Evaluation of the lipolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. *Journal of Applied Microbiology*. 84:839-846.
- Kusumaningrum, H. D., Riboldi, G., Hazelger, W. C., Beumer, R. R. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*. 85(3):227-236.
- Marques, S. C. 2008. Caracterização bioquímica de bactérias psicrotólicas de tanques de refrigeração de leite e formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável. Thesis (doctorate degree in food science). Universidade Federal de Lavras.
- Martins, E. A., Germano, P. M. L. 2011. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: occurrence, quantification and serogrouping. *Food Control*. 22:297-302.
- Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T., Rattan, A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 24(1):25-29.

- Mehrabian, S., Jaber, E. 2007. Isolation, identification and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from meat products in Tehran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10(11):122-126.
- Melo, P. C., Ferreira, L. M., Nader Filho, A., Zafalon, L. F., Vicente, H. I. G., Souza, V. 2013. Comparison of methods for detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(1):119-124.
- Menezes, P. M. S, Coelho, L. M., Costa, F. N. 2010. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária dos presuntos fatiados comercializados na cidade de São Luís, MA. *Biológico*. 72(1):11-17.
- Miller, J. M. 2007. *The microbiology bench companion*. 2. Ed. Washington: ASM press. 120p.
- Mottin, V. D., Fish, E., Mürmann, L., Cardoso, M. I. 2006. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. em embutidos de carne suína cozidos e fatiados comercializados em supermercados do município de Porto Alegre, RS. *Revista Higiene Alimentar*. 21(150):191-192.
- Nörner, M. B. L.; Mentges, M. L.; Silveira, S. T.; Tondo, E. C.; Brandelli, A. 2011. A psychrotrophic *Burkholderia cepacia* strain isolated from refrigerated raw milk showing proteolytic activity and adhesion to stainless steel. *Journal of Dairy Research*. 78:257–262.
- Oliveira, M. M. M., Brugnera, D. F., Alves, E., Piccoli, R. H. 2010. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41:97-106.
- Österblad, M., Pensala, O., Peterzéns, M., Helenius, H., Huovinen, P. 1999. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 43:503-509.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P. 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*. 65:859-867.
- Rhoades, J. R, Duffy, G., Koutsoumanis, K. 2009. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. *Food Microbiology*. 26:357-376.

- Ribeiro Júnior, J. C., Alcântara, B. K., Beloti, V. 2016. Spoilage potential of *Paenibacillus* sp. in Brazilian raw milk. *Ciência Rural*. 46(4):637-640.
- Riggio, M. P.; Lennon, A.; Taylor, D. J.; Bennett, D. 2011. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. *Veterinary Microbiology*. 150:394-400.
- Rodrigues, L. B., Santos, L. R., Tagliari, V. Z., Rizzo, N. N., Trenhago, G., Oliveira, A. P., Goetz, F., Nascimento, V. P. 2010. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41:1082-1085.
- Rossi Junior, O. D., Vidal-Martins, A. M. C.; Salotti, B. M.; Burger, K. P.; Cardozo, M. V.; Cortez, A. L. L. 2006. Estudo das características microbiológicas do Leite UAT ao longo de seu processamento. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*. 73(1):27-32.
- Ruaro A., Andrighetto C., Torriani S., Lombardi A., (2013) Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative *Staphylococci* isolated from raw milk and cheese of North Italy. *Food Microbiology*. 34:106-111
- Säde, E. 2011. *Leuconostoc* spoilage of Refrigerated, packaged foods. Thesis. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland.
- Sakate, R. I., Aragon, L. C., Raghianti, F., Landgraf, M., Franco, B. D. G. M., Destro, M. T. 2003. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in pré-sliced vacuum-package salami in São Paulo-Brazil. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 53(2):184-187.
- Sarria, J. C., Vidal, A. M., Kimbrough Iii, R. C.. Infections caused by *Kluyvera* species in humans. 2001. *Clinical Infection Diseases*. 33(7):69-74
- Sezer, M. T., Gültekin, M. S., Ersoy, F. F. 1996. A case of *Kluyvera cryocrescens* peritonitis in a CAPD patient. *Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*. 16(3):326-327.
- Silva, N. Da.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A.; Taniwaki, M. H.; Santos, R. F. S. Dos; Gomes, R.A.R. 2010. Manual de métodos de análise microbiológica de alimento e água. São Paulo: Varela. 624p.
- Song, Y.; Kato, N.; Liu, C.; Matsumiya, Y.; Kato, H.; Watanabe, K. 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic



- spacer region and its flanking 23S rRNA. FEMS Microbiology Letters. 187(2):167-173.
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J. 2012. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. Food Research International. 45:502-531.
- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L., Svabic-Vlahovic, M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology. 38(5):428-432.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Cirković, I. 2007. Quantification of biofilm in microtitar plates: overview of testing conditions and practical recommendation for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica section B-Microbiology. 115: 891-899
- Vallim, D. C., Hofer, C. B., Lisbôa, R. C., Barbosa, A. V., Rusak, L. A., Reis, C. M. F., Hofer, E. 2015. Twenty years of *Listeria* in Brazil: occurrence of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* serovars in food samples in Brazil between 1990 and 2012. BioMed Research International. 2015:articleID:540204, 8p.
- Valsechi, O. A. 2006. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Universidade Federal de São Carlos. 48p.