UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Freqüência de *Listeria monocytogenes* em mortadelas e
comportamento durante o processamento industrial e estocagem

Luciano dos Santos Bersot

Dissertação para obtenção do
grau de MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Maria Teresa Destro

São Paulo
2000

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bersot, Luciano dos Santos
B535f Frequência de *Listeria monocytogenes* em mortadelas e
comportamento durante o processamento industrial e estocagem /
Luciano dos Santos Bersot. -- São Paulo, 2000.
66p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.

Orientador: Destro, Maria Teresa

1. Ciência dos alimentos 2. Microbiologia de alimentos
3. *Listeria* : Bacteriologia I. T. II. Destro, Maria Teresa,
orientador.

641 CDD

Luciano dos Santos Bersot

**FREQÜÊNCIA DE *Listeria monocytogenes* EM MORTADELAS E
COMPORTAMENTO DURANTE O PROCESSAMENTO INDUSTRIAL E
ESTOCAGEM**

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Prof. Dr. Maria Teresa Destro
Orientador/Presidente

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto
1º. Examinador

Prof. Dr. Mariza Landigraff
2º Examinador

São Paulo, 30 de maio de 2000.

PARA

Meu pai Vilnes, fiel aos filhos, um fã incondicional que mesmo com todas as dificuldades que passou não perdeu as esperanças. (*in memoriam*)

A minha querida mãe Marilda, que com toda força e dedicação, fez com que eu pudesse estar aqui.

A Sueli Menezes de Oliveira, ou melhor, de Oliveira Bersot, companheira de todos os momentos, que hoje é a razão da minha vida.

A VOCÊS, AGRADEÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS:

A Profa. Dra. Maria Teresa Destro pela excelente orientação sempre presente, pelas dicas, empurrões, pelo convívio agradável, pela dedicação inestimável, pela confiança e carinho.

A Profa. Dra. Mariza Landgraf do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por todo carinho, confiança e dedicação dispensados.

A Profa. Dra. Bernadette Gombossy de Mello Franco do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pelo apoio, confiança e dedicação.

A Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de mestrado e reserva técnica.

Ao Dr. Rubison Olivo, por toda ajuda na formulação e preparo das mortadelas.

Ao Químico Paulo Donizete Guarnieri por toda ajuda na formulação e preparo das mortadelas até altas horas da madrugada.

Ao Químico Fábio Oliveira Franco, pela utilização eficiente dos termopares e confecção dos gráficos de estocagem das amostras.

À Médica Veterinária Paula Tavolaro por toda sua ajuda nas análises microbiológicas.

Ao Prof^o Roberto Rochadelli, da Universidade Federal do Paraná - *Campus* Palotina pela análise estatística dos dados experimentais.

A bibliotecária Adriana Barreiros, da Biblioteca do Conjunto das Químicas, pela revisão da citação das referências bibliográficas.

Ao Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto pela ajuda científica, por ouvir minhas lamentações, por sua amizade inestimável, por estar sempre presente.

Ao farmacêutico Cristiano Andrigheto pelas dicas em informática, pelas informações quentes da internet, pela amizade e convívio.

Aos amigos Claudia e Wladimir pelo convívio sadio, pela amizade e troca de experiências nesses anos.

À nutricionista Emilieme de Almeida Martins, por sua bondade, amizade e disposição para ajudar a todos.

Aos colegas Alcina, Alexandra, Analí, Andréia, Denize, Dory, Elisa, Flávia I, Flávia II, Jane, Maria, Mariana, Paula I, Viviane, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela troca de experiência nesses anos de convívio.

As Funcionárias Lúcia e Kátia, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela amizade, pela dedicação ao trabalho e pelas risadas que demos nesses anos com as piadas e cantorias.

Aos colegas Cybelle e Walfrido, da Universidade Federal do Paraná - *Campus* Palotina por quebrarem todos meus galhos entre as idas e vindas de Palotina.

Ao Prof. Waldir Hamann, Diretor do *Campus* Palotina, pelo apoio e compreensão durante minhas ausências no *campus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Características do microrganismo.....	02
1.2. Condições de multiplicação.....	02
1.3. Importância da <i>L. monocytogenes</i> para saúde pública e na contaminação dos alimentos.....	03
1.4. Efeitos de fatores físicos e químicos na termorresistência de <i>L. monocytogenes</i> em alimentos.....	12
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Avaliação da presença de <i>Listeria monocytogenes</i> em mortadelas comercializadas no município de São Paulo.....	17
3.1.1. Obtenção das amostras.....	17
3.1.2. Análise de <i>L. monocytogenes</i>	17
3.2. Processamento das mortadelas	20
3.2.1. Preparo do inóculo de <i>L. monocytogenes</i>	20
3.2.2. Preparo das mortadelas de primeira linha (TOP) e de segunda linha (POP) e inoculação do “pool” de <i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	21
3.2.3. Determinação da população de <i>L. monocytogenes</i> inoculada.....	24
3.2.4. Determinação do número de células de <i>L. monocytogenes</i> sobreviventes.....	26
3.2.5. Estocagem das amostras processadas.....	26
3.2.6. Análises físico-químicas.....	27
3.3. Comportamento de <i>L. monocytogenes</i> em mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo.....	28
3.3.1. Obtenção das amostras.....	28
3.3.2. Estocagem das amostras.....	28
3.3.3. Quantificação do número de <i>L. monocytogenes</i> presente...	28
3.4. Análise estatística.....	31

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. Avaliação da presença de <i>L. monocytogenes</i> em mortadelas comercializadas no município de São Paulo.....	32
4.2. Avaliação do comportamento de <i>L. monocytogenes</i> frente ao tratamento térmico das mortadelas e às condições de estocagem	36
4.3. Avaliação do comportamento de <i>L. monocytogenes</i> em mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo.....	40
5. CONCLUSÕES.....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
7. ANEXOS.....	65
Anexo 1: Ingredientes empregados à emulsão cárnea para o processamento das mortadelas de primeira linha (TOP) e de segunda linha (POP).....	65
Anexo 2: Comportamento da temperatura durante o processo de cozimento.....	66
Anexo 3: Formulação do Ágar Hemolítico Ceftazidime Cloreto de Lítio (HCLA).....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de análise de presença/ausência de <i>L. monocytogenes</i> em 25 g, segundo a metodologia recomendada por FARBER et al. (1994).....	19
Figura 2: Representação esquemática da produção de mortadela utilizada no experimento.....	23
Figura 3: Representação esquemática da metodologia para enumeração de <i>L. monocytogenes</i> modificada de FARBER et al., (1994) pela técnica dos tubos múltiplos (NMP/g) (PEELER et al., 1992) das amostras de mortadela artificialmente contaminadas.....	25
Figura 4: Representação esquemática seguida para a estocagem das amostras e plano de amostragem.....	27
Figura 5: Representação esquemática da metodologia para enumeração de <i>L. monocytogenes</i> naturalmente presente modificada de FARBER et al., (1994) pela técnica dos tubos múltiplos (NMP/g) (PEELER et al., 1992) nas amostras de mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo.....	30
Figura 6: Frequência de <i>Listeria</i> em amostras de mortadelas coletadas no município de São Paulo, SP.....	32
Figura 7: População de <i>L. monocytogenes</i> em mortadelas naturalmente contaminadas, fatiadas e embaladas a vácuo, estocadas sob refrigeração.....	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Comportamento da <i>L. monocytogenes</i> frente aas mortadelas de primeira linha (TOP) e segunda linha (POP) com inóculo baixo (IB) e inóculo alto (IA) estocadas em refrigeração (5-8°C) durante 30 dias.....	37
Tabela 2: Composição centesimal média das mortadelas de primeira linha (TOP) e de segunda linha (POP).....	38
Tabela 3: População média (Logaritmo do Número Mais Provável por grama - log NMP/g) de <i>L. monocytogenes</i> naturalmente presente em mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo durante a estocagem sob refrigeração.....	41
Tabela 4: Incremento da população média (Logaritmo do Número Mais Provável por grama - log NMP/g) de <i>L. monocytogenes</i> naturalmente presente em mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo durante a estocagem sob refrigeração.....	44

RESUMO

A importância da *Listeria monocytogenes* como patógeno veiculado por alimentos, causador de grave quadro de infecção é bem conhecida. Devido a sua grande capacidade de sobrevivência às condições adversas do ambiente, o presente trabalho teve como objetivos verificar a frequência de *L. monocytogenes* em mortadelas comercializadas no município de São Paulo, SP; avaliar o comportamento de 2 níveis de inóculos de *L. monocytogenes* frente ao processamento térmico de mortadelas de 2 formulações em diferentes condições de estocagem e avaliar o comportamento de *L. monocytogenes* naturalmente presente em mortadelas fatiadas, embaladas a vácuo, comercializadas e estocadas sob refrigeração, durante sua vida de prateleira. As amostras foram analisadas pelos métodos de Presença/Ausência ou NMP/g. Verificou-se que 26,7% das amostras de mortadelas analisadas foram positivas para *L. monocytogenes*. O processamento térmico convencional aplicado na cocção das mortadelas (74°C no ponto mais frio) foi suficiente para redução dos inóculos em até 3 ciclos log independente da formulação do produto. A temperatura de estocagem, refrigeração ou temperatura ambiente, não interferiu na recuperação do microrganismo. Nas mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo foi observado aumento médio de 2,5 ciclos log do NMP de *L. monocytogenes*/g durante a vida de prateleira do produto, com níveis de *L. monocytogenes* próximos a 2,0 log NMP/g no final da vida de prateleira do produto. De acordo com os resultados obtidos concluiu-se que *L. monocytogenes* é um patógeno freqüente em mortadelas; o tratamento térmico de mortadelas é suficiente para redução de até 3 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes*, não tendo sido observada presença do microrganismo durante estocagem por 30 dias e que mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo mantidas sob refrigeração são susceptíveis a multiplicação de *L. monocytogenes* durante sua estocagem refrigerada, representando um risco à população susceptível.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, processamento de mortadelas, alimento pronto para consumo.

SUMMARY

L. monocytogenes is an important foodborne pathogen that can cause life threatening infections. The importance of *L. monocytogenes* as a foodborne pathogen is well known. Its capacity to resist to adverse environmental conditions makes this microorganism a cause of concern for the food industry. The objectives of this study were to evaluate: the incidence of *L. monocytogenes* in mortadella samples commercialised in São Paulo, SP, BR; the behaviour of 2 levels of *L. monocytogenes* during the processing of 2 formulations of the product stored at different conditions and the behaviour of indigenous *L. monocytogenes* present in vaccum-packed sliced mortadella during the shelf life of the product. Samples were analysed by the Presence/Absence technique or By MPN. 26.7% of the mortadella samples were positive for *L. monocytogenes*. The conventional cooking process (74°C in the coldest point) was sufficient to reduce the population of the microorganism in up to 3 log and the formulation of the product did not interfere with this reduction. *L. monocytogenes* was not detected during storage of the product for up to 30 days under cold storage (5-8°C) or room temperature (25°C). The vaccum-packed sliced product showed a mean increase of 2.5 log of MPN/g during its shelf life with the bacterium reaching populations around 2 log MPN/g by the end of the period. It could be concluded that *L. monocytogenes* is very frequent in mortadellas; for this product the cooking process is sufficient to reduce up to 3 log of *L. monocytogenes*. This microorganism could not be recovered during storage for up to 30 days, indicating no sub-lethal damage. The vaccum-packed sliced product stored under refrigeration is susceptible to *L. monocytogenes* growth and can be considered risky to susceptible population.

Key-words: *Listeria monocytogenes*, mortadella processing, ready-to-eat meat.

1. INTRODUÇÃO

A partir das 2 últimas décadas, a *Listeria monocytogenes* foi reconhecida como um dos mais importantes patógenos causadores de toxinfecção de origem alimentar (MEAD et al., 1999). Diferentemente da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, a listeriose não pode ser considerada como uma doença nova (ROCOURT, COSSART, 1997).

Entre 1891 e 1911 já fora descrito um organismo muito semelhante à *L. monocytogenes* e em 1926 este mesmo organismo foi isolado de fígado de coelhos e cobaia, sendo denominado como *Bacterium monocytogenes*. No ano seguinte novos isolados foram obtidos de fígado de roedores, o que levou à denominação de *L. hepatolytica* (BAHK, MARTH, 1990).

O primeiro caso de listeriose humana ocorreu em 1929, estabelecendo-se a partir de então a correlação entre *L. monocytogenes* e meningite em humanos (BAHK, MARTH, 1990).

Em 1933 a doença em ovinos foi identificada e caracterizada pelos animais apresentarem movimento de rotação, sintomatologia que ainda hoje serve para identificar a encefalite causada por *L. monocytogenes* em ruminantes. Somente 8 anos mais tarde, a bactéria foi denominada *Listeria monocytogenes*. (BAHK, MARTH, 1990).

Em 1950, estudos médicos sugeriram a possibilidade das toxinfecções alimentares causadas pela *L. monocytogenes*. Todavia, somente em 1981, no Canadá, comprovou-se o primeiro surto de listeriose veiculada por alimentos.

Este surto envolveu 41 pessoas e o alimento contaminado foi uma salada preparada a base de repolho cru - “coleslaw”. O repolho cru adubado com estrume de ovinos suspeitos de serem portadores da bactéria, foi o veículo da contaminação. Desde então inúmeros surtos têm sido relatados em muitos países (ROCOURT, COSSART, 1997).

1.1. Características do microrganismo

A *L. monocytogenes* é um bastonete gram positivo, não esporogênico, catalase positivo e anaeróbio facultativo. Apresenta motilidade a 25°C pela formação de flagelo polar, perdendo esta capacidade quando incubado a 35°C. Tem como características peculiares a relativa resistência térmica e capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração (ICMSF, 1996).

Existem 13 sorotipos de *L. monocytogenes* que podem causar doença, porém 95% dos isolados pertencem aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b (ROCOURT, COSSART, 1997).

Além da *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii* são as espécies já detectadas nos alimentos e ambiente (JAY, 1996; MCLAUCHLIN, 1997).

Muito raramente, *L. seeligeri* e *L. ivanovii* foram implicadas em casos de listeriose humana (MCLAUCHLIN, 1996).

1.2. Condições de multiplicação

A *L. monocytogenes* está amplamente distribuída no meio ambiente podendo ser encontrada em águas residuais, rios, solo cultivável (FARBER,

PETERKIN, 1991) e ambientes úmidos ou secos (COMI et al., 1992). Tem sido isolada de vários nichos incluindo o ambiente das plantas de processamento de alimentos. Nestes ambientes, uma vez estabelecido, o microrganismo dificilmente é eliminado (MCCARTHY, 1997). Portanto, devido a esta característica ubiquitária, a *L. monocytogenes* pode facilmente entrar na cadeia alimentar humana (NOTERMANS et al., 1998).

Outros pontos importantes a serem considerados são as características desse microrganismo em multiplicar-se numa ampla faixa de temperatura compreendida entre -0,4 e 50°C (DUGGAN, PHILLIPS, 1998); pH entre 4,3-9,6 (FARBER et. al., 1989; FARBER, HARWIG, 1996); atividade de água $\geq 0,90$, concentrações de cloreto de sódio superiores a 10%, ou mesmo em presença de nitrito de sódio (FARBER, HARWIG, 1996).

1.3. Importância da *L. monocytogenes* para saúde pública e na contaminação dos alimentos

Sua importância para a saúde pública está no fato dela causar uma severa infecção em humanos e nos animais caracterizada por meningite, septicemia ou aborto. Os indivíduos preferencialmente atingidos são os neonatos, as gestantes e os imunodeprimidos. O índice de mortalidade nesses casos pode variar de 20 a 30% (ICMSF, 1996; MCLAUCHLIN, 1996; RAINALDI et al., 1991; ROCOURT, COSSART, 1997).

As gestantes geralmente não apresentam sintomatologia característica, podendo ocorrer em alguns casos sintomas semelhantes a um resfriado, com febre, mialgia e cefaléia. Através da corrente sangüínea da mãe, o microrganismo atinge o feto (infecção transplacentária) causando aborto geralmente no terceiro trimestre de gestação, ou doença no neonato (ROCOURT, 1996) Outra forma de contaminação dos neonatos ocorre durante a passagem pelo canal vaginal. O período de incubação é de 10-20

dias, com desenvolvimento posterior de meningite (SCHLECH, 1996). Cerca de 11% dos neonatos acometidos por meningite podem apresentar seqüelas (ROCOURT, 1996).

Nos indivíduos imunossuprimidos ou idosos geralmente ocorre meningite ou meningoencefalite, devido ao tropismo do microrganismo pelo sistema nervoso central. Outra forma comum da doença nesses indivíduos é a septicemia (ROCOURT, 1996). Também tem sido relatada a forma gastroentérica, em decorrência ao consumo de alimentos contaminados (DALTON et al., 1997).

A incidência de listeriose em gestantes varia, de acordo com relatos, de 4,7-30 casos por 100.000 nascimentos. Em pacientes transplantados este valor sobe para 200 casos/100.000; pacientes com câncer, 13 casos/100.000; indivíduos com mais de 65 anos, 1,4 casos/100.000 e em indivíduos aidéticos a incidência varia de 52-115 casos/100.000 aidéticos. Considerando o conjunto dos indivíduos citados, em torno de 30% pode apresentar seqüelas (ROCOURT, 1996).

Em humanos sadios, estima-se que 5% sejam portadores intestinais da *L. monocytogenes*. (FARBER, HARWIG, 1996).

Desde 1981 investigações de surtos e casos esporádicos de listeriose têm indicado claramente que alimentos contaminados são a fonte mais freqüente de transmissão da listeriose. Todavia, somente em 1988, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu que o consumo de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* seria uma fonte primária de transmissão da listeriose humana (ROCOURT, 1996).

Vários surtos da enfermidade têm sido descritos pelo mundo. Na Europa e nos EUA diversos surtos de listeriose foram atribuídos ao consumo de leite pasteurizado e produtos de laticínio (FARBER, PETERKIN, 1991), vegetais crus e queijos de alta umidade (TOBIA et al., 1997). Alguns surtos da doença também estavam relacionados ao consumo de produtos cárneos (CANTONI et al., 1989; CDC, 1999; JACQUET et al., 1995; MCLAUCHLIN et al., 1991; PARODI et al., 1990; ROCOURT, COSSART, 1997). Casos

esporádicos da doença foram registrados, tendo sido causados pelo consumo de aves, produtos de salsicharia, pescado e outros produtos cárneos (FARBER, PETERKIN, 1991; ROCOURT, COSSART, 1997).

Na Inglaterra o primeiro caso de listeriose humana tendo como fonte a carne, ocorreu em 1988, pelo consumo de frango cozido. Porém nos EUA, o primeiro caso ocorreu em 1989, tendo como fonte, salsicha de peru (KERR et. al., 1988a,b).

L. monocytogenes de sorogrupo 4 está mais relacionada a surtos, enquanto que o sorogrupo 1/2 é o mais detectado em alimentos e o mais envolvido em casos esporádicos (JAY, 1996; SCHLECH, 1996). Nos países de clima temperado ocorre uma variação sazonal da doença, com maior número de casos nos meses de outono e inverno seguido pela primavera e verão (ROCOURT, 1996).

Recentemente, ocorreram 2 surtos de listeriose envolvendo produtos cárneos. O primeiro teve registro em 22 estados dos EUA, no período compreendido entre 2 de agosto de 1998 e 8 de fevereiro de 1999, atingindo 100 pessoas, com 21 mortes (15 adultos e 6 neonatos). Os alimentos envolvidos foram salsichas e “deli meats”. A indústria localizada em Michigan, “Bil Mar Foods”, iniciou o recolhimento dos lotes sabidamente contaminados evitando que a disseminação fosse ainda mais grave (CDC, 1999).

O segundo surto, noticiado apenas pelos jornais, está ocorrendo na França desde meados de novembro de 1999. Até o presente momento já foram registradas 7 mortes e 26 doentes. Evidências epidemiológicas indicam que o provável alimento responsável é a língua de porco em gelatina, mas ainda não existe confirmação do produtor. (PROMEDMAIL, 2000).

De maneira geral a contaminação dos produtos cárneos se dá pelo meio ambiente, pelos ingredientes e pela própria contaminação primária da carne (KORSAK et al., 1998).

Segundo o Food Safety and Inspection Service (FSIS) do Ministério da Agricultura americano, os produtos cárneos são responsáveis, todos os anos, por 5 milhões de casos de doenças de origem alimentar e 4000 mortes sendo *L. monocytogenes* um dos 4 patógenos mais freqüentes (FSIS, 1998).

Baseado nos casos de listeriose já identificados, estima-se nos EUA uma incidência anual de 1600 casos, com aproximadamente 400 mortes (SHANK et al., 1996). Já pelos dados do FoodNet (CDC-EUA), estima-se que ocorram 2493 casos de listeriose de origem alimentar anualmente, com 499 mortes, o que torna a *L. monocytogenes* um dos 5 patógenos que mais causa morte nos EUA, sendo responsável por 28% do total de óbitos causados por doenças de origem alimentar, naquele país (MEAD et al., 1999).

Apesar da magnitude da sintomatologia com possibilidades de seqüelas e da alta mortalidade, a incidência de listeriose é considerada baixa. Na Inglaterra ocorreram 116 casos em 1996, número que pode ser considerado baixo quando comparado às toxinfecções causadas por *Salmonella* spp. e *Campylobacter* (29.887 e 43.877 casos respectivamente) (DUGGAN, PHILLIPS, 1998).

No Canadá poucos casos foram confirmados: em 1993, 56 casos e em 1994, 46 casos (FARBER, HARWIG, 1996).

Na Alemanha, estima-se que ocorram 200 casos de listeriose/ano para uma população de 80 milhões. Isso resulta em aproximadamente 3 casos por 1 milhão de habitantes. Nos EUA estes valores são de 4 a 5 por milhão. Esses dados mostram, segundo BUCHANAN et al. (1997), que a listeriose é uma doença relativamente rara.

Recentes estudos epidemiológicos têm indicado uma diminuição da incidência de listeriose humana em alguns países (TAPPERO et al., 1995). Ao contrário, em outros países, o número de casos de listeriose tem aumentado. Segundo FARBER, HARWIG (1996), isso pode ser devido ao aumento de detecções e interesse nas pesquisas desse patógeno ou pode ser decorrente de uma real modificação na prevalência da *L. monocytogenes*

no ambiente e alimentos e conseqüentemente maior freqüência de exposição humana. O aumento da incidência nesses países também pode ser devido ao aumento da população susceptível, por exemplo, pessoas que sofrem de câncer, aidéticos, idosos ou pacientes transplantados.

A dose mínima infectante para a listeriose ainda não foi estabelecida, mas acredita-se que se fosse baixa, maior número de casos seriam relatados frente ao que tem observado. De fato, de acordo com dados dos surtos já ocorridos, têm-se pouca evidência de que baixos números de *L. monocytogenes* no alimento possam causar listeriose em indivíduos susceptíveis (FARBER, HARWIG, 1996). Porém, segundo a Food and Agriculture Organization - FAO, a partir da análise de alimentos envolvidos em surtos e casos esporádicos de listeriose, encontraram-se tanto contagens elevadas (acima de 10^3 UFC/g) quanto contagens baixas (inferiores a 10^2 UFC/g). Partindo-se destes achados, poder-se-ia dizer que doses iguais ou maiores a 10^2 UFC de *L. monocytogenes*/g poderiam causar quadro de toxinfecção alimentar (FAO, 1999).

Mas não se pode descartar que, no geral, a dose infectante dos patógenos de origem alimentar está relacionada, entre outros fatores, com as condições do hospedeiro, o nível de contaminação do alimento pelo patógeno, a quantidade ingerida de alimento e a virulência das cepas. (FAO, 1999; HEISICK et al., 1995). Segundo DESEO (1999), a contaminação de alimentos com níveis acima de 10^3 UFC/g é considerada alta para a *L. monocytogenes*.

Experimentos feitos com animais saudáveis indicaram que a ingestão de quantidades de *L. monocytogenes* entre 10^3 e 10^6 UFC seriam suficientes para causar dano a saúde (MADDEN, 1992).

Tendo visto a importância da *L. monocytogenes* para a saúde pública, sabe-se que os alimentos são uma importante fonte de contaminação aos humanos. Os alimentos, por sua vez, se contaminam em praticamente toda a cadeia produtiva.

O habitat primário de *L. monocytogenes* é o solo e a água. Vegetais podem contaminar-se pelo solo ou adubos usados como fertilizantes. Animais podem carrear a bactéria sem apresentar doença, e contaminar os alimentos de origem animal como carne e leite. A *L. monocytogenes* tem sido encontrada numa grande variedade de produtos crus, como carnes cruas e vegetais, assim como alimentos que se contaminam após o processamento, principalmente os alimentos prontos para consumo (CDC, 1998).

Nos alimentos, pode-se dizer que quase todos que são ingeridos pelos humanos, estão contaminados pela *L. monocytogenes*. Ela também pode ser encontrada nos equipamentos e utensílios da indústria de alimentos (JEONG, FRANK, 1994; MAÑERU, GARCÍA-JALÓN, 1995; DESTRO et al., 1996; RODRIGUES, 1999) sendo estes considerados importantes fontes de contaminação. Deve-se ressaltar ainda sua grande capacidade de formar biofilmes, o que a torna ainda mais preocupante para a indústria de alimentos (ARCHER, 1990). Baseado nessas informações, a Organização Mundial de Saúde concluiu que a eliminação total de *L. monocytogenes* de todos os alimentos é impraticável e pode ser impossível (FARBER, HARWIG, 1996).

A maior importância da *L. monocytogenes* para a indústria de alimentos talvez seja o fato dela poder sobreviver e se multiplicar em temperatura de refrigeração, fator que se constitui num obstáculo para a maioria dos patógenos. Esse dado é relevante principalmente para os alimentos refrigerados prontos para consumo, caso sejam insuficientemente processados e/ou contaminados após o processamento (MCCARTHY, 1997).

Ainda se sabe pouco sobre os mecanismos que permitem que este microrganismo se multiplique em temperaturas baixas. Em outros microrganismos psicrófilos, estudos têm sugerido que mudanças na composição dos ácidos graxos da membrana polar lipídica sejam

responsáveis por manter a integridade dessa membrana em uma ampla faixa de temperaturas (JONES et al., 1997).

Os alimentos implicados nos surtos de listeriose que causaram maior número de casos são aqueles produtos que permitem a multiplicação da *L. monocytogenes* até populações elevadas antes do consumo. Fatores tais como pH, atividade de água, presença de conservantes e vida de prateleira, são utilizados como parâmetros para avaliar se um determinado alimento suporta ou não a multiplicação da *L. monocytogenes* (FARBER, HARWIG, 1996).

Porém não devem ser considerados somente esses parâmetros. Em alguns produtos há interferência de outros fatores que atuam de forma decisiva para o controle efetivo do desenvolvimento da *L. monocytogenes*, como a presença de bacteriocinas e componentes da formulação como ácidos, condimentos e especiarias (FARBER, DALEY, 1994).

Segundo ROCOURT, COSSART (1997), com base nos dados obtidos com os surtos e casos esporádicos de listeriose ocorridos nas últimas décadas, pode-se afirmar que alguns alimentos são mais importantes que outros na veiculação do agente. Os alimentos de maior risco são: 1 - os prontos para consumo, estocados sob refrigeração, com vida de prateleira longa, conforme detectado por QVIST et al. (1994) e 2 - os alimentos contaminados com populações elevadas de *L. monocytogenes* (>100 UFC/g ou ml) (MCLAUCHLIN, 1996). Deve-se ressaltar que alimentos prontos para consumo são aqueles que não necessitam de nenhum tipo de preparo antes do consumo (FARBER, HARWIG, 1996). KRÄMER, BAUMGART (1993) afirmam que o consumo a frio dos embutidos cozidos tipo "frankfurter", é um dos maiores fatores de risco ao consumidor, possibilitando a ingestão de quantidades apreciáveis de *L. monocytogenes*.

Os alimentos prontos para consumo vêm tendo sua produção aumentada em resposta à demanda por produtos de fácil emprego, com maior vida de prateleira, e também por serem mais práticos (JUNEJA et al., 1997). Isso tem contribuído para tornar a *L. monocytogenes* ainda mais

preocupante, pois por não requererem cocção antes do consumo e serem armazenados por vários dias em temperaturas de refrigeração, favorecem a multiplicação de *Listeria*, caso presente, em detrimento de outros microrganismos (QVIST et al., 1994).

Pesquisadores têm demonstrado que produtos prontos para consumo tratados termicamente apresentam, geralmente, diminuição acentuada ou eliminação da microbiota acompanhante, principalmente de bactérias ácido-láticas. Com isso, a manipulação no pós-processamento favorece a contaminação pela *L. monocytogenes* que devido a ausência de competidores tem sua multiplicação facilitada durante a estocagem em temperaturas de refrigeração (SCHMIDT, KAYA, 1990; SCHMIDT, 1995; GUANG-HUA, MAO-ZHAN, 1997).

Com relação aos limites toleráveis de *L. monocytogenes*/g de alimento, os países apresentam condutas diferentes. No Estados Unidos da América se estabeleceu a chamada “Tolerância Zero”, onde não é permitida a presença do patógeno em 25 gramas de qualquer tipo de alimento (SHANK et al., 1996). Na Alemanha, alimentos que contém níveis acima de 10^4 UFC/g, são automaticamente recolhidos. Esse mesmo país considera que a “Tolerância Zero” não é realista e portanto não se justifica sua aplicação (FARBER, 1993).

No Canadá, para alimentos prontos para consumo, os limites toleráveis de *L. monocytogenes* baseiam-se na determinação de quais alimentos suportam o seu desenvolvimento. Com essas informações e baseando-se principalmente em parâmetros intrínsecos, como atividade de água e pH, declaração no rótulo da vida de prateleira e condições de estocagem, estabeleceu-se uma classificação em 3 categorias. De acordo com esse critério, as mortadelas e outros produtos prontos para consumo ligados a surtos ou casos esporádicos de listeriose foram classificados na Categoria I, que determina a ausência de *L. monocytogenes* em 50 g do produto (FARBER, HARWIG, 1996).

No Brasil, a Portaria 451 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1997b), determina ausência de *L. monocytogenes* em 25 g em vários tipos de queijo, porém, para produtos cárneos, não há exigência da pesquisa do referido patógeno.

Vários estudos têm sido feitos para se quantificar o número de *L. monocytogenes* nos alimentos. NOTERMANS et al. (1998) indicam que a maioria dos alimentos contém <2 log de UFC de *L. monocytogenes*/g. Apesar de níveis acima de 4 log/g serem raramente observados, valores acima de 5 log/g têm sido encontrados. Os mesmos autores compilaram dados de 7063 produtos, e indicaram que do total de produtos cárneos analisados 13,7% encontram-se na faixa de 0,04-1 UFC/g, 7,8% entre $1-10^2$ UFC/g e 1,6% acima de 10^2 UFC/g.

FARBER e PETERKIN (1991) relataram que os níveis de *L. monocytogenes* em carnes geralmente são inferiores a 10^3 UFC/g. Isso demonstra que a maioria dos alimentos está contaminada, mas sempre em níveis baixos.

Schmidt, Kaya (1990) apud SCHMIDT (1995) encontraram níveis de *L. monocytogenes* acima de 10^5 UFC/g em 5,8% das amostras de embutidos tipo "frankfurter" fatiados e embalados a vácuo, e entre 10^2-10^4 UFC/g, em 70%.

Inúmeros fatores físicos e químicos contribuem para essas diferenças de populações de *L. monocytogenes*, mas a falta de padronização de uma metodologia para enumeração de *L. monocytogenes* em alimentos, deve ser considerada (JAY, 1996).

1.4. Efeitos de fatores físicos e químicos na termorresistência de *L. monocytogenes* em alimentos

Em resposta ao surto ocorrido em 1992 na França pelo consumo de língua suína em gelatina, reiniciaram-se os estudos sobre a efetividade dos tratamentos térmicos aplicados no processamento dos alimentos. Numerosos estudos demonstram que pode ocorrer aumento da resistência térmica da *L. monocytogenes* pela produção de proteínas de choque térmico (LINTON et al., 1992; CARLIER et al., 1996a; LOU, YOUSEF, 1996; AUGUSTIN et al., 1998). Esse aumento é observado principalmente quando a elevação da temperatura do meio ocorre lentamente. Como exemplo, o choque térmico causado na *L. monocytogenes* por aquecimento a 48°C/10 minutos, pode aumentar o valor $D_{55^{\circ}\text{C}}$ mais do que duas vezes (LINTON et al., 1992). Na prática isso pode ocorrer durante a fabricação de alimentos em grande quantidade, o que causa um maior tempo de aquecimento (CARLIER et al., 1996a; AUGUSTIN et al., 1998).

O que não se sabe é, se a partir de uma cultura que desenvolveu resistência térmica pode-se produzir subculturas também termorresistente. Alguns autores refletem sobre esta possibilidade, porém outros dizem que não se obtém subculturas mais termorresistentes do que a original (AUGUSTIN et al., 1998).

No conceito da teoria dos obstáculos, dois ou mais agentes conservantes aplicados ao produto podem agir sinergisticamente para causar lesões nos microrganismos, inibindo-os. Porém no processamento de um alimento, raramente estes fatores agem simultaneamente e sim seqüencialmente. Se o primeiro fator não é letal ao microrganismo, a adaptação desse ao estresse subletal pode fortalecer o microrganismo e permitir sua sobrevivência aos obstáculos subseqüentes. Isso explica a proteção cruzada, e introduz o “Fortalecimento ao Estresse” como um novo

conceito que complementa o conceito dos obstáculos (SCOTT, 1989; LOU, YOUSEF, 1996).

Além da temperatura de aquecimento, numerosos fatores, incluindo o estágio fisiológico das células, faz com que a *L. monocytogenes* adquira termotolerância durante incubação a temperaturas elevadas, em condições subletais. Essa termotolerância pode ser atribuída a produção de proteínas de choque térmico e/ou a modificações dos ácidos graxos da membrana celular (CARLIER et al., 1996b). Em geral, o valor D para a *L. monocytogenes* é de 0,2 minutos a 70°C, e os valores z variam de 5 a 8°C (FARBER, PETERKIN, 1991).

MEHTA, TANINI (1994) observaram que a redução do teor de gordura no queijo cheddar não interferiu na multiplicação de *L. monocytogenes* durante a estocagem em temperatura de refrigeração. De fato, a resistência térmica da *L. monocytogenes* no creme ou no leite desnatado é similar (FARBER, 1989).

Os solutos adicionados em substratos também podem induzir a um aumento na resistência térmica da *L. monocytogenes*, devido a um efeito protetor (MILLER, 1992; SUMNER et al., 1991).

Em produtos cárneos os valores de D observados para *L. monocytogenes* são considerados os maiores, sendo a gordura responsável por aumentar a resistência térmica (FAIN et al., 1991). MACKEY et al. (1990) atribuíram o aumento dos valores de D para *L. monocytogenes* devido às concentrações de NaCl.

A mistura de agentes conservantes como xarope de milho, dextrose, lactose, fécula, nitrito e cloreto de sódio parecem também desempenhar um efeito protetor ao aquecimento, aumentando o valor $D_{62^{\circ}\text{C}}$ de 61 segundos para 7,1 minutos em embutidos cárneos (FARBER 1989).

QUINTAVALLA, CAPANINI (1991) demonstraram em seu estudo de termorresistência “in vitro” que o substrato pode influenciar os valores D da *L. monocytogenes*. A presença de gordura e sais de cura no meio induz a uma maior termotolerância, por proteger o microrganismo da ação do calor.

Já HU, SHELEF (1996) ao testarem a adição de banha na massa de embutidos de fígado suíno, observaram que a multiplicação da *L. monocytogenes* diminuía quando aumentava-se o conteúdo de gordura. Os autores discutem que a maior quantidade de banha levava a um aumento da concentração dos sais solúveis na água, exercendo uma maior atividade antilisteria.

No processo de formação de uma emulsão óleo e água, o tamanho das partículas de gordura tem grande importância na multiplicação dos microrganismos. Quanto maior o tamanho das partículas de gordura, maior será o interstício aquoso entre os glóbulos de gordura e consequentemente melhores serão as condições de multiplicação dos microrganismos. BROCKLEHURST et al. (1995) evidenciaram em seu estudo que quando as partículas de gordura na emulsão apresentaram tamanho de 2 μ m, o interstício aquoso não permitiu a movimentação e multiplicação da *L. monocytogenes*.

O processamento de mortadelas baseia-se na obtenção de um produto cozido a partir da emulsão de carnes e gordura animal, onde esses ingredientes variam, de acordo com as características sensoriais do produto que se quer produzir. A legislação nacional vigente (BRASIL, 1997a) ainda permite que seja adicionada à emulsão o amido, numa proporção de até 5% do peso da massa, em substituição à proteína de origem animal, obtendo-se um produto com menor custo. Com isso tem-se várias formulações de um mesmo tipo de alimento.

Como a formulação básica da mortadela é baseada principalmente nas carnes bovina e suína, gordura animal, amido, condimentos, água e outros componentes, esses ingredientes podem, como apresentado anteriormente, desempenhar ou não uma atividade protetora para *L. monocytogenes*, tornando possível sua sobrevivência à cocção e posterior multiplicação durante a estocagem.

Ainda assim, mesmo que não ocorra tal efeito protetor e a *L. monocytogenes* seja eliminada no processamento térmico, a manipulação pós processamento (fatiamento e envase a vácuo) pode proporcionar a recontaminação do produto. A seguir, a estocagem por longos períodos de tempos em temperaturas de refrigeração pode possibilitar a multiplicação da *L. monocytogenes* até que elevadas populações sejam atingidas, tornando o alimento potencialmente capaz de causar um quadro de listeriose no consumidor.

2. OBJETIVOS

Dada a importância da *L. monocytogenes* nos alimentos, a possibilidade de sobrevivência nos produtos cárneos termoprocessados prontos para consumo, a possível recontaminação pós processamento e a multiplicação durante a estocagem, o presente trabalho teve como objetivos:

- (i) verificar a frequência de *L. monocytogenes* em mortadelas comercializadas no município de São Paulo, SP;
- (ii) avaliar o comportamento de 2 níveis de inóculos de *L. monocytogenes* frente ao processamento térmico da mortadelas preparadas a partir de 2 formulações e mantidas sob diferentes condições de estocagem;
- (iii) avaliar o comportamento de *L. monocytogenes* naturalmente presente em mortadelas fatiadas, embaladas a vácuo, comercializadas e estocadas sob refrigeração, durante sua vida de prateleira.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Avaliação da presença de *Listeria monocytogenes* em mortadelas comercializadas no município de São Paulo

3.1.1. Obtenção das amostras

Trinta amostras de mortadelas, de diversas marcas comerciais, foram coletadas em diferentes regiões do Município de São Paulo, SP, durante o período de março a junho de 1998.

3.1.2. Pesquisa de *L. monocytogenes*

As amostras, em fatia única pesando aproximadamente 300 g e com cerca de 2 cm de espessura, foram transportadas até o laboratório de Microbiologia de Alimentos da USP em caixas isotérmicas, sendo analisadas em até 24 horas após a coleta.

As amostras foram analisadas segundo a metodologia recomendada por FARBER et al. (1994) (Figura 1).

A partir dos 300 g de mortadela, tomando-se o cuidado de desprezar, quando da amostragem, porções superficiais das mesmas, pesou-se a unidade analítica de 25 g em saco plástico estéril, onde foram adicionados 225 ml de *Listeria* Enrichment Broth – LEB, formulação UVM (CM863-OXOID suplementado com SR142E-OXOID). Após homogeneização em “stomacher” (Stomacher 400-Seward, England) incubou-se o homogeneizado a 30°C/24 h.

A seguir transferiu-se a partir do LEB, uma alíquota de 0,1 ml para o caldo Fraser (CM895-OXOID suplementado com SR156E-OXOID). Incubou-se a 37°C/24 horas.

Após a incubação, a partir do tubo de caldo Fraser escurecido (positivo) procedeu-se ao isolamento por meio da técnica de esgotamento, nos ágar seletivos PALCAM (CM877-OXOID suplementado com SR150E-OXOID) e HCLA (Formulação Anexo 3). O tubo de Fraser não escurecido foi reincubado por 24 horas adicionais e se houvesse o escurecimento, procedia-se a mesma sequência de isolamento.

As colônias típicas no ágar Palcam caracterizavam-se por apresentar 2mm de diâmetro, coloração verde escuro ou marrom, com centro escuro e côncavo, halo negro e fundo cereja. No ágar HCLA, observado em luz transmitida num ângulo de 45°, apresentavam coloração azul-esverdeada, com aspecto de vidro moído, rodeadas por uma zona estreita de hemólise.

De 3 a 5 colônias típicas foram purificadas em ágar soja triptona (CM131-OXOID) adicionada de 0,6% de extrato de levedura (L21-OXOID) (TSA-YE) para posterior confirmação bioquímica (utilização de glicose, ramnose, manitol e xilose, motilidade em tubo com ágar semi sólido, hemólise em ágar sangue de cavalo a 4%, produção de catalase).

Figura 1: Representação esquemática de análise de presença/ausência de *L. monocytogenes* em 25 g, segundo a metodologia recomendada por FARBER et al. (1994). LEB: *Listeria* Enrichment Broth (Formulação UVM); PAL: ágar Palcam; HCLA: ágar hemolítico ceftazidime cloreto de lítio; TSA-YE: ágar soja triptona com 0,6% de extrato de levedura

3.2. Processamento das mortadelas

Os processamentos das mortadelas foram realizados na Usina Piloto de uma indústria de processamento de carnes, fiscalizada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF).

Foram empregadas duas formulações: uma de primeira linha (TOP) e outra de segunda linha (POP). Essas formulações diferenciaram-se basicamente nas quantidades empregadas de carne bovina, amido, carne mecanicamente separada, miúdos e proteína texturizada de soja.

Os processamentos foram repetidos 3 vezes.

3.2.1. Preparo do inóculo de *L. monocytogenes*

Foram utilizadas 5 cepas de *L. monocytogenes*: 3 cepas previamente isoladas de mortadelas no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 1 cepa de referência (Scott A) e 1 cepa proveniente de surto causado por queijo no Canadá (F6861), ambas fornecidas pelo Dr. J. M. Farber da Food Directorate, Health Canada, Ottawa.

Cada cepa mantida em ágar conservação e estocada em geladeira, foi resuspensa separadamente em tubos contendo caldo soja triptona (CM129-OXOID) adicionada de 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE) e incubado a 37°C/24h. A seguir, cada caldo foi semeado separadamente em placas de petri contendo ágar TSA-YE. As placas foram incubadas a 37°C/24h.

Após o período de incubação, transferiu-se uma colônia de cada cepa, separadamente, para um erlenmeyer contendo 100 ml de caldo TSB-YE. Incubou-se a 37°C/24 h.

A seguir, cada caldo foi submetido, separadamente, a diluições decimais seriadas em solução salina 0,85%, até que se atingisse as

concentrações de *L. monocytogenes* necessárias para se obter os inóculos de 10^0 - 10^1 UFC/g e 10^2 - 10^3 UFC/g na emulsão cárnea. A confirmação dos inóculos foi realizada através de semeadura “pour plate” em ágar TSA-YE das diluições adequadas obtidas, com incubação a 37°C/24h.

Imediatamente antes da inoculação na massa, cada um dos 5 inóculos suspensos em 10 ml, foi misturado num único frasco estéril, para que as 5 cepas fossem adicionadas à emulsão, num procedimento único.

3.2.2. Preparo das mortadelas de primeira linha (TOP) e de segunda linha (POP) e inoculação do “pool” de *L. monocytogenes*

Todos os ingredientes utilizados e suas proporções estão indicados no Anexo 1.

Antes do início do processamento das mortadelas pesou-se toda a matéria-prima de origem animal, vegetal, aditivos, condimentos. Após esse etapa iniciou-se a adição da matéria-prima de origem animal, congelada, ao cutter (Seydelmann Aalen Stuttgart, Germany), seguida da batedura. Em seguida adicionou-se a matéria-prima de origem vegetal (fécula de mandioca) os aditivos (nitrito de sódio, cloreto de sódio, polifosfatos, eritorbato de sódio), condimentos, água/gelo. Deu-se seqüência a batedura até que a massa atingisse o ponto de emulsão. Após, adicionou-se o toucinho em cubos, terminando portanto o processo tecnológico do preparo da emulsão das mortadelas TOP e POP.

Este procedimento foi repetido 2 vezes para cada formulação, para que pudessem ser inoculados os 2 níveis de *L. monocytogenes*. Como procedimento padrão, processou-se sempre a mortadela TOP com inóculo baixo, seguida da mortadela POP com inóculo baixo. Depois, processou-se a mortadela TOP com inóculo alto, seguida da mortadela POP com inóculo alto.

O inóculo preparado como indicado no item 3.2.1 foi adicionado à emulsão cárnea e homogeneizado no próprio “cutter”.

Após a inoculação, a massa obtida foi transferida para embutideira à vácuo (Vemag-Robot 500) sendo a emulsão embutida em tudo impermeável de poliamida, calibre 100mm com 15 cm de comprimento e grampeada nas 2 extremidades (Clipadora Poly-clip system/Niedecker GMBH n. 02049, Germany). Prepararam-se assim mortadelas com peso aproximado de 400g.

As mortadelas foram colocadas em gaiolas suspensas e cozidas em estufa de cozimento (Maurer MC3.1, Computer Liquid Smoke 12, Germany) com atmosfera de 100% de vapor.

Para controle do cozimento, utilizaram-se termopares com registro de temperaturas a cada 10 segundos no centro da massa e no ambiente, conforme figura apresentada no Anexo 2.

O cozimento seguiu a seguinte programação do equipamento: i) 60°C/1h; ii) 70°C/1h; iii) 80°C até que fosse atingida a temperatura de 74°C no centro do produto. Em seguida deu-se um choque térmico (esguicho de água fria por 25 minutos), e mantiveram-se as mortadelas em repouso até que fosse atingido o resfriamento completo a temperatura ambiente.

A representação esquemática do processamento das mortadelas pode ser observado na Figura 2.

Figura 2: Representação esquemática da produção de mortadela utilizada no experimento.

3.2.3. Determinação da população de *L. monocytogenes* inoculada

Após o embutimento e antes da cocção, retiraram-se 3 mortadelas cruas de cada formulação (TOP + inóculo baixo, POP + inóculo baixo, TOP + inóculo alto; POP + inóculo alto) para que fosse realizada a enumeração da população de *L. monocytogenes* presente.

Estas amostras foram combinadas e submetidas a análise através da técnica do Número Mais Provável por grama (NMP/g) (PEELER et al., 1992) a partir de modificações da metodologia recomendada por FARBER et al. (1994) (Figura 3).

Para a determinação da população de *L. monocytogenes* inoculada foram retiradas assepticamente porções de 100g de cada uma das 3 mortadelas, combinando-se estas porções em saco plástico estéril. Procedia-se a homogeneização manual dessa massa e a partir do homogeneizado retirava-se a unidade analítica de 25 g.

Aos 25 gramas da amostra composta, adicionaram-se 225 ml LEB, e após homogeneização em “stomacher” obtinha-se a diluição 10^{-1} . A partir dessa diluição inocularam-se 3 séries de tubos, em triplicata, sendo a primeira série de 3 tubos estéreis vazios, aos quais transferiram-se 10 ml da diluição obtida; à segunda série de 3 tubos estéreis com 9 ml de caldo LEB, transferiu-se 1 ml da diluição, e à terceira série de 3 tubos com 9 ml de caldo LEB, transferiu-se 0,1 ml. A sequência de tubos foi incubada a 30°C/24 horas.

A seguir, seguiu-se o procedimento descrito no item 3.1.2.

De acordo com a confirmação de cada um dos tubos positivos calculou-se o NMP de *L. monocytogenes*/g consultando-se a tabela do NMP (PEELER et al., 1992).

Figura 3: Representação esquemática da metodologia para enumeração de *L. monocytogenes* modificada de FARBER et al., (1994) pela técnica dos tubos múltiplos (NMP/g) (PEELER et al., 1992) das amostras de mortadela artificialmente contaminadas. LEB = *Listeria* enrichment broth; PAL= ágar Palcam; HCLA = ágar hemolítico ceftazidime cloreto de lítio; TSA-YE: ágar soja triptona com 0,6% de extrato de levedura

3.2.4. Determinação do número de células de *L. monocytogenes* sobreviventes

Imediatamente após o final do processamento, as amostras foram acondicionadas em embalagens isotérmicas e transportadas, para o laboratório de Microbiologia da USP para a determinação do número de células de *L. monocytogenes* sobreviventes. O tempo transcorrido entre o preparo das mortadelas e o início das análises microbiológicas não excederam 12 horas.

Assim como para as amostras cruas, utilizou-se o método do Número Mais Provável (NMP), como descrito no item 3.2.3., sendo que neste caso cada amostra era composta por 5 mortadelas, com análise sendo realizada em triplicata. Desta forma 15 mortadelas eram utilizadas a cada vez.

A esta determinação convencionou-se chamar de T_0 .

3.2.5. Estocagem das amostras processadas

Após o procedimento de análise no T_0 , (item 3.2.4) as amostras restantes foram divididas em 2 grupos que foram estocadas por 30 dias nas temperaturas de 5-8°C e 25°C. A temperatura de 25°C foi escolhida uma vez que é prática corrente em nosso país a manutenção do produto a temperatura ambiente.

A cada 10 dias de estocagem, ou seja, dias 10, 20 e 30 (T_{10} , T_{20} e T_{30} , respectivamente) para amostras incubadas em ambas as temperaturas, repetiu-se o procedimento de análise descrito no item 3.2.4.

Para estas determinações as unidades analíticas também eram compostas por porções retiradas de 5 mortadelas, sendo a análise realizada também em triplicata.

A representação esquemática utilizada na estocagem das amostras e no plano de amostragem, está indicada na Figura 4.

Figura 4: Representação esquemática seguida para a estocagem das amostras e plano de amostragem

Com isso, foram realizadas 21 análises por tipo de mortadela a cada processamento (triplicata no T_0 , triplicata no T_{10} , T_{20} e T_{30} nas duas temperaturas de estocagem) num total de 3 processamentos para cada formulação (Top + inóculo alto; Top + inóculo baixo; Pop + inóculo alto; Pop + inóculo baixo).

3.2.6. Análises físico-químicas

A fim de se determinar a composição centesimal das mortadelas das 2 formulações (TOP e POP) foram realizadas as seguintes análises físico-químicas: amido (%), gordura (%), nitrito de sódio (ppm), proteína (%) e cloreto de sódio (%), seguindo as técnicas recomendadas em INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1976), feitas somente nas amostras processadas termicamente em T_0 .

Determinou-se a atividade de água das mortadelas em T_0 , T_{10} , T_{20} e T_{30} , utilizando-se o aparelho Aqua Lab CX-2 - Decagon Devices.

3.3. Comportamento de *L. monocytogenes* em mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo

3.3.1. Obtenção das amostras

Foram obtidas mortadelas diretamente da indústria embaladora no dia do fatiamento e envase. Esta empresa apenas fatiava e embalava o produto, recebendo as mortadelas, em sua embalagem original, de terceiros.

Após a retirada das amostras na indústria, estas eram colocadas em recipiente isotérmico contendo gelo reciclável e transportadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia dos Alimentos da FCF/USP, para que fossem imediatamente estocadas em refrigerador vertical (Marca Reubly), regulado para 8°C.

Cada embalagem continha 250g de mortadela fatiada e embalada a vácuo, com prazo de validade de 40 dias declarado no rótulo.

O plano de amostragem foi realizado em 3 experimentos (A, B, C) para verificação da repetibilidade dos resultados. Em cada experimento foram coletadas 15 embalagens que foram submetidas à análise em triplicata em cada um dos 5 dias de amostragem. Desta forma um total de 45 amostras foi analisado.

3.3.2. Estocagem das amostras

As amostras foram estocadas por até 40 dias em refrigerador comercial (Marca Reubly) numa faixa de temperatura de 5-8°C. A cada 10 dias de estocagem, amostras eram retiradas e submetidas a análise.

3.3.3. Quantificação do número de *L. monocytogenes* presente

Quantificou-se o número de células de *L. monocytogenes* presentes no produto de maneira semelhante ao descrito em 3.2.3, com algumas modificações a saber (Figura 5):

Em cada dia de amostragem 3 embalagens de 250 g cada eram analisadas separadamente. Pesavam-se assepticamente 50g de mortadela de cada embalagem em saco plástico estéril, retirando-se porções do produto de toda a embalagem a fim de se obter uma unidade analítica representativa.

Aos 50 gramas, adicionaram-se 450 ml de LEB, e após homogeneização em “stomacher” obteve-se a diluição 10^{-1} . A partir dessa diluição inocularam-se 4 séries de 3 tubos, sendo a primeira série composta de 3 sacos plásticos estéreis vazios, aos quais transferiram-se 100 ml da diluição obtida; à segunda série de 3 tubos vazios, transferiram-se 10 ml da diluição obtida; à terceira série de 3 tubos estéreis com 9 ml de caldo LEB, transferiu-se 1 ml da diluição. A inoculação da quarta série de 3 tubos foi precedida pela transferência de 1 ml da diluição 10^{-1} para 1 tubo contendo 9 ml de solução salina 0,85%, obtendo-se a diluição 10^{-2} . A partir desse tubo inoculava-se a quarta série de 3 tubos, transferindo-se 1 ml da diluição 10^{-2} para 3 tubos contendo 9 ml de caldo LEB. A seqüência de diluições foi incubada a 30°C/24 horas (Figura 5).

A partir deste ponto procedeu-se conforme descrito em 3.2.3.

Figura 5: Representação esquemática da metodologia para enumeração de *L. monocytogenes* naturalmente presente modificada de FARBER et al., (1994) pela técnica dos tubos múltiplos (NMP/g) (PEELER et al., 1992) nas amostras de mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo. LEB: *Listeria* Enrichment Broth (Formulação UVM); PAL: ágar Palcam; HCLA: ágar hemolítico ceftazidime cloreto de lítio; TSA-YE: ágar soja triptona com 0,6% de extrato de levedura

3.4. Análise estatística

Os dados experimentais obtidos com os valores de atividade de água e das populações de *L. monocytogenes* encontradas nas mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo nos dias 0, 10, 20, 30 e 40 foram submetidos à Análise de Variância. Para verificar quais tratamentos diferiram, aplicou-se o Teste Tukey (Teste T - teste da mínima diferença estatística) para realizar comparações pareadas das médias dos tratamentos com significância de 5% ($p > 0,05$).

Foi utilizado o programa estatístico "STATISTICA for Windows" - Release 5,0 A Stat Soft, Inc. (1984-1995).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da presença de *Listeria monocytogenes* em mortadelas comercializadas no município de São Paulo

Verificou-se que das 30 amostras de mortadela analisadas, 11 (36,7%) foram positivas para *Listeria* spp, sendo que 08 (26,7%) foram positivas para *L. monocytogenes* (Figura 6).

Figura 6: Frequência de *Listeria* em amostras de mortadelas coletadas no município de São Paulo, SP (30 amostras).

A presença do microrganismo em aproximadamente 27% das amostras examinadas é bastante preocupante principalmente por ser este um produto de amplo consumo em nosso país.

Esta contaminação pode ser procedente da matéria-prima, ou decorrente de contaminação pós-processamento.

Autores de todo o mundo pesquisam a presença da *L. monocytogenes* em alimentos cárneos crus e prontos para consumo, e os resultados encontrados são bastante variados.

Segundo ROCOURT, COSSART (1997), entre 11 e 52% dos animais abatidos nos diversos países são portadores de *L. monocytogenes*, e a contaminação da carcaça pode ocorrer pelo contato do conteúdo gastrointestinal com o músculo durante o abate. Portanto, as condições higiênicas na obtenção da carne bovina, suína, etc., poderão determinar uma maior ou menor contaminação inicial, que interferirá na qualidade do produto final.

Sob esse aspecto a carne bovina crua pode apresentar índices variados de contaminação por *L. monocytogenes*, com valores compreendidos entre 11,3% e 49% de positividade (BREER, SCHOPFER, 1988; MACLAIN, LEE, 1988). FENLON et al. (1996) detectaram *L. monocytogenes* em mais de 90% das amostras de carne moída coletadas em diversos pontos de venda no Reino Unido.

MAÑERU, GARCÍA-JÁLÓN (1995) pesquisando *L. monocytogenes* em diversos alimentos espanhóis, encontraram positividade para o microrganismo em 19,5% e 29,3% das amostras de carne bovina e suína analisadas, respectivamente.

Das 5089 amostras de produtos cárneos analisadas em vários países, e compiladas por JAY (1996) 13% foram positivas para *L. monocytogenes*. No estudo realizado por KORSACK et al. (1998) na Bélgica, 22% das carcaças bovinas estavam contaminadas por *L. monocytogenes*, tendo sido este o microrganismo patogênico mais encontrado. Na Coréia, amostras de

carne crua coletadas em supermercados apresentaram 5,8% de contaminação por *L. monocytogenes* (CHUNG et al., 1995).

Pesquisas realizadas no Brasil por DESTRO et al. (1991) indicaram a presença de *L. monocytogenes* em 65% das amostras de carne moída e em 80 % das amostras de lingüiça frescal estudadas. Já MESQUITA (1991) encontrou *L. monocytogenes* em apenas 2% das amostras de carne moída coletadas na cidade de Goiânia, GO.

Na análise de produtos de salsicharia, muitos autores têm detectado o gênero *Listeria*. Na Itália, COMI et al. (1992) detectaram 43% de amostras de salsichas positivas para *Listeria* spp. sendo 14% positivas para *L. monocytogenes*. Já CASOLARI et al. (1994) também na Itália verificaram a presença de *L. monocytogenes* em 85% das amostras de salsichas. GUNASINGHE et al. (1994) na Inglaterra, ao analisarem amostras de salsichas encontraram 44% contaminadas com *Listeria* spp. e 14% com *L. monocytogenes*. Em Singapura, DORIS, SEAH (1996) encontraram 6,4% de amostras positivas para *L. monocytogenes* em embutidos cozidos. FARBER, DALEY (1994) no Canadá, encontraram 7% das amostras de patê contaminadas pela *L. monocytogenes*.

RIJPENS et al. (1997) na Bélgica, analisaram produtos a base de carne de aves prontos para consumo encontrando 15,5% de amostras positivas para *L. monocytogenes*. Os autores supõem que a alta incidência foi possivelmente devido à contaminação cruzada no ambiente de processamento do produto ou na comercialização.

Num estudo realizado por Teufel et al. (1994) na Alemanha, apud NOTERMANS et al. (1998), 23,1% dos produtos cárneos prontos para consumo analisados apresentaram-se contaminados por *L. monocytogenes*.

TOBIA et al. (1997) encontraram 21% de positividade para o gênero *Listeria* e 15% para *L. monocytogenes*, em diversos produtos de salsicharia argentinos. Em trabalho realizado na Espanha, MORENO et al. (1997) detectaram a presença de *L. monocytogenes* em 8,4% das amostras de

salsichas analisadas. No Brasil, DESTRO et al. (1991) verificaram a presença de *L. monocytogenes* em 70% das amostras de salsichas analisadas.

Já VORSTER et al. (1993), na África do Sul, não detectaram *L. monocytogenes* em salsichas, isolando apenas *Listeria* spp. em 4,3% das amostras. Schmidt (1989) apud SCHMIDT, KAYA (1990) detectaram na Alemanha, 17% das amostras de embutidos tipo "frankfurter" fatiados e embalados a vácuo contaminadas pela *L. monocytogenes*.

CAMPILLO et al. (1999) detectaram na Espanha, a presença de *L. monocytogenes* em 11,4% das amostras de produtos cárneos curados frescos. Porém o patógeno não foi detectado nos produtos curados cozidos.

FARBER, HARWIG (1996) indicam que a incidência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos prontos para consumo varia de 1-10%.

Concordando com esses valores, CONTRERAS et al. (1998), encontraram 8 amostras (10%) de mortadelas positivas para *L. monocytogenes*, na cidade de Campinas-SP. Já MAÑERU, GARCÍA-JALÓN (1995) na Espanha encontraram 10,5% para *Listeria* spp. e 3,5% de *L. monocytogenes* nestes produtos.

Conforme observado nas diferentes pesquisas realizadas com *L. monocytogenes* em embutidos cárneos prontos para consumo, os percentuais de isolamento foram bastante variados. Comparando esses resultados com os encontrados no presente trabalho, pode-se observar que os valores obtidos para a presença de *L. monocytogenes* em mortadela adquiridas na cidade de São Paulo (26,7%) foram bem superiores aos encontrados na maioria dos estudos. Esta diferença pode ser devido as condições de produção, à manipulação do produto após o processamento, e ainda à sensibilidade do método de detecção utilizado pelos diferentes pesquisadores.

Assim, pode-se supor que a presença de *L. monocytogenes* nesses alimentos termoprocessados possa ser devido a sobrevivência ao tratamento térmico inicial, quer seja pela resistência térmica do microrganismo ou pelo efeito protetor dos diferentes ingredientes; recuperação e multiplicação das bactérias injuriadas durante o armazenamento e/ou a contaminação pós-processamento.

4.2. Avaliação do comportamento de *L. monocytogenes* frente ao tratamento térmico das mortadelas e às condições de estocagem

Uma vez que a frequência de amostras de mortadela contaminadas com *L. monocytogenes* foi elevada, buscou-se avaliar a provável causa desta contaminação.

Das prováveis hipóteses, 3 foram avaliadas nessa etapa, ou seja: (a) eficiência do tratamento térmico na inativação de *L. monocytogenes* presente no produto tanto em baixo número (10^0 - 10^1 UFC/g) quanto em número mais elevado (10^2 - 10^3 UFC/g); (b) efeito da composição do produto sobre a termorresistência da *L. monocytogenes* e (c) possibilidade de recuperação da *L. monocytogenes* que possa ter permanecido viável após o tratamento térmico, durante as condições normais de estocagem das mortadelas (5-8 e 25°C/30 dias).

Os resultados apresentados são referentes às médias das determinações feitas em triplicata em cada um dos 3 experimentos realizados.

Nas análises realizadas para a determinação da população de *L. monocytogenes* inoculada, confirmaram-se os inóculos iniciais desejados (Tabela 1). Verifica-se também na Tabela 1 que não se detectou o microrganismo no produto cozido independentemente do tempo e da temperatura de estocagem.

Pelos resultados obtidos, o processamento térmico convencional aplicado na cocção das mortadelas (cocção até que se atingisse 74°C no ponto mais frio da massa) foi suficiente para redução a níveis não detectáveis do número de células de *L. monocytogenes* para ambos inóculos (10^0 - 10^1 UFC/g e 10^2 - 10^3 UFC/g), independente do tipo de formulação de mortadela (TOP ou POP). Desta forma, obteve-se uma redução de 3 ciclos logarítmicos na população do microrganismo. Na Tabela 1 pode-se verificar também que a composição do produto não afetou a atividade de água do mesmo que variou entre 0,960 e 0,971. A análise de variância destes valores indicou serem eles estatisticamente iguais ($p>0,05$).

Tabela 1: Comportamento da *L. monocytogenes* frente as mortadelas de primeira linha (TOP) e de segunda linha (POP) com inóculo baixo (IB) e inóculo alto (IA) estocadas em refrigeração (5-8°C) durante 30 dias.

Etapa	Tipo de Mortadela							
	TOP IA		TOP IB		POP IA		POP IB	
	a_w	NMP ^{ab} /g	a_w	NMP/g	a_w	NMP/g	a_w	NMP/g
Inóculo	ND	1.100	ND	7,03	ND	1.100	ND	8,8
T ₀	0,971	<0,3	0,971	<0,3	0,966	<0,3	0,968	<0,3
T ₁₀	0,966	<0,3	0,968	<0,3	0,970	<0,3	0,970	<0,3
T ₂₀	0,960	<0,3	0,962	<0,3	0,963	<0,3	0,963	<0,3
T ₃₀	0,960	<0,3	0,964	<0,3	0,964	<0,3	0,968	<0,3

ND - não determinado

^aos resultados são idênticos aos obtidos na temperatura de 25°C

^b média geral das triplicatas de cada um dos 3 processamentos

a_w = atividade de água

Uma vez que não foi detectada a presença de *L. monocytogenes* no produto, pode-se afirmar que as células foram inativadas, pois caso tivessem sofrido qualquer tipo de injúria sub-letal, o tempo e as diferentes

temperaturas de estocagem, além de fatores intrínsecos, permitiriam a recuperação e posterior detecção.

Com relação a atividade de água, geralmente este tipo de embutido apresenta valores de a_w sempre superiores a 0,96, que não são considerados obstáculos ao desenvolvimento de *L. monocytogenes*, mas sim, valores ótimos para multiplicação.

Os resultados da composição centesimal média dos dois tipos de mortadelas preparadas estão indicados nas Tabela 2.

Tabela 2: Composição centesimal média das mortadelas de primeira linha (TOP) e de segunda linha (POP)

Determinação	Tipo de Mortadela	
	TOP	POP
Amido (%)	2	5
Gordura (%)	27	30
Nitrito (ppm)	4,5	4,5
Proteína (%)	12	9
NaCl (%)	2,5	2,5

As diferenças na composição centesimal das mortadelas de primeira linha (TOP) e segunda linha (POP) foram principalmente com relação ao teor de amido e à gordura que foram superiores na POP; e a proteína total que foi superior na TOP. Porém a composição não afetou a termorresistência da *L. monocytogenes* nem causou qualquer efeito protetor durante o processamento térmico.

Pesquisadores de todo o mundo têm trabalhado para avaliar a capacidade de sobrevivência da *L. monocytogenes* ao tratamento térmico

aplicado aos alimentos, principalmente os prontos para consumo. O valor D típico da *L. monocytogenes* é de 2 minutos a 60°C (AUGUSTIN et al., 1998).

HARRISON, SHINEMAN (1992) ao estudarem a inativação da *L. monocytogenes* em salsichas de peru, concluíram que o processamento comercial aplicado neste tipo de produto foi suficiente para reduzir a população de *L. monocytogenes* em 4 log. A temperatura utilizada foi de 87,8°C no centro do produto.

Em estudo realizado para verificar a sobrevivência da *L. monocytogenes* no processamento de presuntos, CARLIER et al. (1996b) empregaram tratamento térmico de 58,8°C/2h. Utilizando um inóculo baixo (<10 UFC/g) não foi detectada a presença do microrganismo após 70 dias de estocagem. Utilizando-se inóculo de 10⁵ UFC/g detectou-se a presença do patógeno 55 e 65 dias após o cozimento. Os autores consideraram que os tratamentos térmicos utilizados nas indústrias para a produção de presuntos cozidos são satisfatórios para a garantia da qualidade microbiológica, uma vez que os protocolos de cozimento empregados pelas indústrias geralmente preconizam temperaturas ainda mais elevadas no centro do produto. Além disso, a contaminação da matéria-prima é sempre mais baixa que a utilizada no segundo experimento.

Em trabalho realizado por MCCARTHY (1997) em alimentos marinhos prontos para consumo foram inoculados 3,0 log UFC de *L. monocytogenes*/g de produto que foi submetido ao tratamento térmico (ebulição por 5 minutos). O autor verificou que o tratamento térmico aplicado foi suficiente para reduzir a *L. monocytogenes* a níveis não detectáveis, levando-o a concluir que a contaminação geralmente existente naquele tipo de produto ocorre no pós-processamento, seja por manipulação inadequada ou pelas condições de estocagem.

ROERING et al. (1998) ao estudarem a resistência térmica da *L. monocytogenes* em “summer sausage” embaladas à vácuo, verificaram que temperaturas de 77°C/150 seg, foram suficientes para uma redução de 3 log de *L. monocytogenes*. Temperaturas de 66°C/240 seg proporcionaram uma

redução de 2 log. O valor $D_{66^{\circ}\text{C}}$ foi de 1,28 minutos, e $D_{77^{\circ}\text{C}}$, 0,84 minutos, para o mesmo produto. Com esses resultados os autores concluíram que a pasteurização da “summer sausage” em temperaturas de $77^{\circ}\text{C}/60\text{-}120$ seg é suficiente para eliminação de quantidades apreciáveis *L. monocytogenes*.

PASSOS, KUAYE (1998) observaram que a fritura de hambúrgueres por 4 minutos em cada lado, numa temperatura de 190°C , promoveu a redução da população de *L. monocytogenes* em 3,7 ciclos logarítmicos.

Baseados nos estudos de termotolerância realizados pelos diversos autores citados, os resultados do presente estudo mostram que o tratamento térmico convencional (74°C no ponto frio do produto) empregado para o cozimento de mortadelas permitiu a redução da população de *L. monocytogenes* em até 3 ciclos logarítmicos. Isto indica que, se a matéria-prima apresentar populações de *L. monocytogenes* tão altas quanto 10^3 UFC/g, o tratamento térmico será suficiente para gerar um produto seguro, independente da formulação (TOP ou POP) e independente da temperaturas de estocagem (refrigeração ou ambiente).

4.3. Avaliação do comportamento de *L. monocytogenes* em mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo

Uma vez que o processamento térmico convencional aplicado à produção de mortadelas mostrou-se eficiente na redução da população de *L. monocytogenes* independentemente da formulação ou da temperatura de estocagem, iniciou-se a terceira etapa da pesquisa que visava avaliar o comportamento de *L. monocytogenes* naturalmente presente no produto.

Para tanto procedeu-se a pesquisa e enumeração de *L. monocytogenes* em mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo, durante a vida de prateleira do produto estocado sob refrigeração.

Na Tabela 3 encontram-se as populações médias de *L. monocytogenes* (NMP/g) obtidas para os 3 experimentos realizados (A, B, C) bem como a média geral da população para cada um dos 5 dias de análise (dias 0, 10, 20, 30 e 40).

Tabela 3: População média (Logaritmo do Número Mais Provável por grama - log NMP/g) de *L. monocytogenes* naturalmente presente em mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo durante a estocagem sob refrigeração

Dia	População nos diferentes experimento (log NMP/g) ^Ψ			Média geral [▲] (log NMP [*] /g)
	A	B	C	
0	-1,52	0,04	-0,60	-0,69 ^a
10	-0,85	-0,14	1,05	0,18 ^{a/b}
20	1,98	-0,34	1,66	1,10 ^{a/b}
30	1,10	0,20	0,31	0,54 ^{a/b}
40	1,95	1,37	2,01	1,78 ^b

^Ψ média de 3 determinações

^{*} média dos experimentos A, B e C

[▲] letras coincidentes indicam valores estatisticamente iguais (p>0,05)

Observa-se na Tabela 3 que nos 3 experimentos houve multiplicação da *L. monocytogenes* durante a estocagem refrigerada do produto, independente da contagem inicial. As populações finais atingidas foram de 1,95, 1,37 e 2,01 log de NMP de *L. monocytogenes*/g nos experimentos A, B e C, respectivamente. Na análise de variância dos resultados obtidos nos 3 experimentos não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os experimentos A, B e C em cada um dos dias de estocagem ($F_{(2,12)}=0,388782^{ns}$), verificando-se portanto a repetibilidade dos mesmos ($A=B=C$).

A partir desta verificação os resultados foram tratados em conjunto, calculando-se a população média para os 3 experimentos. Foi verificado pela análise de variância diferença significativa entre os resultados obtidos para os diferentes dias de estocagem ($F_{(4,10)}=3,915637^*$). Aplicou-se o teste Tukey, e verificou-se que a diferença estatística apenas ocorria entre os dias 0 e 40 ($p<0,05$).

Estatisticamente, a multiplicação de *L. monocytogenes* até o trigésimo dia não foi significativa, porém em decorrência do acréscimo populacional, o último dia do prazo da vida de prateleira (dia 40), apresentou um nível populacional estatisticamente significativo (Tabela 3).

O comportamento da *L. monocytogenes* em mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo, durante a estocagem em refrigeração nos 3 experimentos e a média geral, pode ser melhor observado na Figura 7.

Figura 7: População de *L. monocytogenes* em mortadelas naturalmente contaminadas, fatiadas e embaladas a vácuo, estocadas sob refrigeração

O incremento da população média de *L. monocytogenes* durante a estocagem, considerando as populações inicial e final de cada experimento, foi de 3,47 ciclos log do NMP de *L. monocytogenes*/g (experimento A); 1,33 ciclos log do NMP de *L. monocytogenes*/g (experimento B); 2,61 ciclos log do NMP de *L. monocytogenes*/g (experimento C), com média geral de 2,47 ciclos log do NMP de *L. monocytogenes*/g, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4: Incremento da população média (Logaritmo do Número Mais Provável por grama - log NMP/g) de *L. monocytogenes* naturalmente presente em mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo durante a estocagem sob refrigeração

Incremento da população (log NMP/g) nos diferentes experimentos ^a				
Intervalo em dias	A	B	C	Média geral ^b (log NMP [*] /g)
0 - 10	0,67	-0,18	1,65	0,71
10 - 20	2,83	-0,20	0,61	1,08
20 - 30	-0,88	0,54	-1,35	-0,56
30 - 40	0,85	1,17	1,70	1,24
Incremento total	3,47	1,33	2,61	2,47

^a média de 3 determinações

^b valores estatisticamente iguais ($p > 0,05$)

* média dos experimentos A, B e C

Através da análise de variância dos incrementos das populações de *L. monocytogenes* nos 3 experimentos, não foi observada diferença estatística ($F_{(2,9)}=0,992647^{ns}$) entre os valores, podendo-se considerar o conjunto dos incrementos como estatisticamente iguais. O mesmo foi observado para as médias gerais dos incrementos ($F_{(3,8)}=0,40938^{ns}$) demonstrando que a multiplicação de *L. monocytogenes* nesse produto segue uma tendência constante apesar da queda na população evidenciada entre o 20º e 30º dia.

Analisando-se a Figura 7, observa-se que apesar de as populações iniciais serem diferentes nos 3 experimentos ao final da vida de prateleira populações bem próximas foram obtidas.

Resultados semelhantes foram verificados por GLASS, DOYLE (1989) que inocularam *L. monocytogenes* (inóculo alto) em mortadelas fatiadas, embaladas a vácuo e estocadas a 4,4°C, observando ao final de 6 semanas, aumento de 3 ciclos log na população de *L. monocytogenes*. Quando o inóculo foi baixo, a população final foi a mesma, indicando que as populações finais independem do inóculo inicial. GUANG-HUA, MAO-ZHAN (1997) também mostraram que as populações de *L. monocytogenes* em produto cárneo chinês embalado a vácuo não dependeram nem da temperatura de estocagem nem do inóculo inicial. Eles verificaram um aumento da população de *L. monocytogenes*, independentemente do inóculo inicial, em até 6 log UFC/g quando estocado a 4 ou 10°C, por 12 dias.

Schmidt (1989) apud SCHMIDT, KAYA (1990) ao examinar embutidos tipo "frankfurter" fatiados e embalados a vácuo comercializados em Frankfurt, encontraram 100 a 200 UFC de *L. monocytogenes*/g, valores próximos aos detectados no presente trabalho, ao final da vida de prateleira.

KRÄMER, BAUMGART (1993) detectaram ao final de 3 semanas de estocagem a 4°C, um aumento de 2,5 log UFC de *L. monocytogenes*/g em embutidos tipo "frankfurter" fatiados e embalados a vácuo.

Já SCHMIDT, KAYA (1990) observaram a influência da temperatura de refrigeração sobre o desenvolvimento da *L. monocytogenes* em amostras de embutidos tipo "frankfurter" fatiados e embalados a vácuo inoculadas com *L. monocytogenes*. As amostras apresentaram aumento da população do patógeno após 3 semanas a 2 e 4°C, em 1 log e 4 log UFC/g, respectivamente. Quando as amostras foram estocadas a 7°C, o aumento foi de 2 log UFC/g em apenas 1 semana.

DUFF et al. (1994) estudaram a multiplicação da *L. monocytogenes* em vários tipos de carnes embaladas a vácuo armazenadas a 5°C e verificaram que dependendo das concentrações de nitrito de sódio, pH, e atividade de água do produto a população de *L. monocytogenes* aumentava 3 log UFC/g entre 16 e 32 dias de estocagem.

Os trabalhos aqui citados não avaliaram o comportamento da *L. monocytogenes* em mortadelas naturalmente contaminadas. Eles foram conduzidos através da inoculação de *L. monocytogenes* em outros tipos de embutidos cárneos cozidos com posterior acompanhamento do comportamento do patógeno durante a estocagem sob refrigeração.

Deve-se salientar, que as condições de multiplicação dos microrganismos nos alimentos artificialmente contaminados, muitas vezes não são as mesmas que ocorrem naqueles naturalmente contaminados. Isto ocorre principalmente porque as doses inoculadas são sempre muito altas e as células inoculadas estão em ótima condição fisiológica o que facilita a competição de *L. monocytogenes* com a microbiota do produto, ocorrendo consequentemente maior multiplicação quando comparada à contaminação natural. Por isso é de grande importância que se estude o desenvolvimento dos microrganismos em situações o mais próximo possível daquelas encontradas por ele no ambiente.

As amostras do experimento A foram as que apresentaram menor população inicial de *L. monocytogenes* (-1,52 log de NMP /g) como pode ser observado na Tabela 3 e Figura 7. Porém, as amostras deste processamento foram as que apresentaram maior multiplicação de sua população durante a vida de prateleira, atingindo 1,95 log do NMP de *L. monocytogenes*/g de produto.

Um dos fatores que poderia explicar o maior incremento da população de *L. monocytogenes* do experimento A (Tabela 4) seria a ausência ou níveis muito baixos de microbiota competidora, principalmente de bactérias ácido-láticas (BAL) que se presentes em altos níveis, poderiam inibir a multiplicação da *L. monocytogenes*. SCHMIDT, KAYA (1990) observaram que em embutidos tipo “frankfurter” fatiados e embalados a vácuo, estocados em temperaturas de refrigeração, a *L. monocytogenes* conseguia multiplicar-se facilmente, devido principalmente a ausência do efeito inibitório das BAL que levaram até 6 semanas para atingir níveis de 10^6 UFC/g.

SCHMIDT, KAYA (1990); KRÄMER, BAUMGART (1993); SCHMIDT (1995) e GUANG-HUA, MAO-ZHAN (1997) relataram que a presença de BAL não interfere na multiplicação de *L. monocytogenes*.

GUANG-HUA, MAO-ZHAN (1997), evidenciaram em seu estudo que populações de 10^6 UFC de BAL/g não foram suficientes para inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* em produto cárneo pasteurizado, embalado a vácuo e estocados sob refrigeração (4 e a 10°C por 12 dias).

SCHMIDT (1995) encontrou populações de BAL superiores a 10^5 UFC/g que também não impediram que a população de *L. monocytogenes* aumentasse em até 7 log em embutidos cozidos tipo “frankfurter” fatiados e embalados a vácuo. SCHMIDT, KAYA (1990) e KRÄMER, BAUMGART (1993) também observaram o mesmo sendo as populações de BAL de 10^6 UFC/g e $>10^7$ UFC/g, respectivamente.

Para as amostras do experimento B o comportamento foi diferente. Apesar de apresentarem maior população inicial de *L. monocytogenes* ao final do 40º dia de estocagem verificou-se uma menor população (Tabela 3, Figura 7). Observou-se ainda que até o 20º dia de estocagem refrigerada não houve aumento da população de *L. monocytogenes*. Neste caso talvez as condições do fatiamento tenham provocado maior contaminação pela *L. monocytogenes*, mas em contrapartida maior contaminação de microbiota competidora que acarretou num prolongamento da fase lag e um menor desenvolvimento da *L. monocytogenes* durante a vida de prateleira.

Segundo SCHMIDT (1995) a contaminação do produto por BAL se dá durante o fatiamento e envase, principalmente se as condições de higiene são precárias e, de acordo com os metabólitos formados, a multiplicação de *L. monocytogenes* pode ser retardada ou inibida durante a estocagem.

No presente estudo não se avaliou a população de bactérias produtoras de ácidos, mas independente de sua presença ou não, verificou-se um aumento médio da população de *L. monocytogenes* em aproximadamente 2,5 ciclos logarítmicos.

Pesquisadores têm demonstrado que produtos que são tratados termicamente geralmente apresentam diminuição acentuada ou eliminação da microbiota acompanhante e com isso, a manipulação no pós-processamento favorece a contaminação pela *L. monocytogenes* facilitando sua multiplicação após longos períodos de manutenção em temperaturas de refrigeração (SCHMIDT, KAYA, 1990; SCHMIDT, 1995; GUANG-HUA, MAO-ZHAN, 1997).

Além da capacidade de multiplicação em baixas temperaturas, *L. monocytogenes* pode tolerar condições de baixa tensão de O₂, apresentando melhor adaptação do que outros microrganismos ao meio, em condições de anaerobiose do que em aerobiose, mesmo em baixas temperaturas (BUCHANAN, KLAWITTER, 1990; FERNÁNDEZ et al., 1997). Isso reafirma a possibilidade de sobrevivência e multiplicação do microrganismo em mortadelas embaladas a vácuo e estocadas sob refrigeração.

ROSSO et al. (1996) estudaram o comportamento da *L. monocytogenes* em carne moída estocada a 4 e 8°C e também concluíram que a temperatura de refrigeração, isoladamente, não é suficiente para controlar o desenvolvimento da *L. monocytogenes* e que a elevação de 4 para 8°C, acarretava uma redução de 75-80% na vida de prateleira dos produtos. Isso mostra que quanto maior for a oscilação da temperatura de estocagem, maior será a possibilidade de aumento do número de células de *L. monocytogenes*, podendo atingir populações elevadas, muito antes do fim da vida útil do alimento.

Já MCCLURE et al. (1991) demonstram “in vitro” que a temperatura de refrigeração (5°C) associada a outros fatores tais como baixa atividade de água, pH baixo, concentrações de nitrito de sódio e concentrações de cloreto de sódio podem causar boa inibição da *L. monocytogenes*.

SCHMIDT, KAYA (1990) e SCHMIDT (1995) demonstraram também, que temperaturas inferiores a 2°C por si só podem ser consideradas bons

fatores de controle ao desenvolvimento de *L. monocytogenes* em embutidos tipo "frankfurter" fatiados e embalados a vácuo.

Muitos estudos têm sido desenvolvidos para observar o comportamento da *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo em embalagens com atmosferas modificadas. Esses estudos têm demonstrado que, além de outros fatores associados, atmosferas de 80-100% de CO₂ são mais eficientes no controle do desenvolvimento da *L. monocytogenes*, aumentando a vida de prateleira do produto. (INGHAM et al., 1990; HART et al., 1991; KRÄMER, BAUMGART, 1993; FERNÁNDEZ et al., 1997). O uso de atmosfera modificada pode ser uma das alternativas para o controle de *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo. Entretanto a adição de elevadas concentrações de CO₂ pode levar à formação de sabores e odores estranhos aos produtos (FERNÁNDEZ et al., 1997).

Em virtude da possibilidade de multiplicação da *L. monocytogenes* em produtos cárneos embalados a vácuo e estocados sob refrigeração, GLASS, DOYLE (1989) indicam a necessidade do uso de alternativas para seu controle tais como: agentes antimicrobianos; temperatura de estocagem abaixo de 2°C; reformulação de produtos; pasteurização pós envase. Os autores não descartam contudo, um efetivo programa de sanificação como forma de eliminar e prevenir a contaminação no pós processamento.

Considerando os dados publicados pela FAO (1999), alimentos contaminados com níveis iguais ou maiores a 100 UFC de *L. monocytogenes*/g são potencialmente capazes de causar listeriose. Por esses dados, as amostras dos 3 experimentos poderiam ser consideradas impróprias para o consumo de acordo com as populações de *L. monocytogenes* apresentadas no final da vida de prateleira, 1,95; 1,37 e 2,01 log do NMP de *L. monocytogenes*/g, respectivamente; populações estas estatisticamente iguais.

Outro dado importante encontrado no presente estudo e que merece destaque, foi o elevado índice de contaminação pela *L. monocytogenes*, das

mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo. Em 100% das amostras detectou-se a presença de *L. monocytogenes*. Isso mostra um alto índice de contaminação no pós processamento, através de equipamentos, manipuladores, ambiente e no fatiamento, como já foi detectado por CAMPILLO et al. (1999).

A baixa população inicial de *L. monocytogenes* nos produtos era esperada e foi também observada por SCHMIDT, KAYA (1990) que relataram que geralmente a contaminação inicial de "frankfurter" é inferior a 10 UFC/g. FARBER, DALEY (1994) encontraram contaminação inicial <10 UFC/g em presunto fatiado e embalado a vácuo. SCHMIDT (1995) verificou que 72% das amostras de embutidos tipo "frankfurter" fatiados e embalados a vácuo coletadas no início da vida de prateleira apresentavam populações inferiores a 10^2 UFC/g.

CAMPILLO et al. (1999) argumentam que a maioria dos alimentos contém populações de *L. monocytogenes* menores que 10^2 UFC/g. Entretanto alguns produtos podem apresentar populações $\geq 10^5$ UFC/g. Isso, segundo os autores, depende fundamentalmente do tipo de produto cárneo, da localização geográfica e/ou metodologia analítica empregada. Pode-se sugerir que o item "período da vida de prateleira" em que o alimento se encontra, deva ser incluído nesta lista.

Este alerta é importante, pois num levantamento de incidência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos estocados em refrigeração por longos períodos, pode-se ter resultados que não correspondem com a realidade da contaminação, já que amostras coletadas no início da vida de prateleira podem apresentar baixas populações de *L. monocytogenes* não detectáveis pelo método, possibilitando resultados falso negativos.

Se for comparada a frequência de amostras positivas para *L. monocytogenes* obtida para a mortadela não fatiada (26,7%) (item 4.1) com a das amostras fatiadas (100%) verifica-se que além da variação causada pelo período da vida de prateleira que o produto se encontra e a metodologia

analítica empregada, o grau de manipulação influenciou decisivamente na maior contaminação das últimas.

De acordo com o exposto e tendo em vista a importância da *L. monocytogenes* como patógeno de origem alimentar, pode-se sugerir que algumas medidas alternativas sejam tomadas com relação a produção e comercialização da mortadela fatiada e embalada a vácuo, a fim de minimizar o desenvolvimento da *L. monocytogenes*:

- a) fatiamento e envase sob excelentes condições de higiene;
- b) estocagem em temperatura máxima de 2-4°C associada à diminuição do prazo de validade desse tipo de produto (máximo 3 semanas);
- c) utilização de atmosfera modificada em substituição a embalagem a vácuo;
- d) adição de bacteriocinas efetivas em produtos cárneos, a fim de inibir a multiplicação de *L. monocytogenes*;
- e) boas práticas de fabricação e higiene;
- f) implantação do sistema HACCP.

ROCOURT (1996) reafirma que a prevenção da contaminação da *L. monocytogenes* nos alimentos se dá através da aplicação de HACCP, e da educação dos manipuladores de alimentos sobre segurança alimentar.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados no presente trabalho, concluiu-se que:

Listeria monocytogenes é um microrganismo de elevada incidência em mortadelas comercializadas em São Paulo, SP;

A contaminação das mortadelas não é decorrente da sobrevivência de *L. monocytogenes* ao tratamento térmico. A formulação do produto ou o nível do inóculo não interferiram na sua eliminação;

Mortadelas fatiadas e embaladas a vácuo mantidas sob refrigeração são susceptíveis a multiplicação de *L. monocytogenes* durante sua vida de prateleira, representando um risco ao consumidor;

Para controle efetivo da contaminação de mortadelas por *L. monocytogenes* deve-se lançar mão impreterivelmente da utilização de boas práticas de fabricação e higiene e implementação de sistema HACCP, como forma preventiva da recontaminação do produto após o tratamento térmico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*:

- ARCHER, D.L. *Listeria monocytogenes*. What is its ecological niche? In: MILLER, A.L., SMITH, J.L., SOMKUTI, G.A., eds. Foodborne listeriosis. Amsterdam: Elsevier, 1990. p.5-8.
- AUGUSTIN, J.C., CARLIER, V., ROZIER, J. Mathematical modelling of the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Microbiol., Oxford, v.84, n.2, p.185-191, 1998.
- BAHK, J., MARTH, E.H. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. In: CLIVER, D.O. ed. Foodborne Diseases, San Diego:Academic Press, 1990. p. 247-257.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília: MA, 1997. 165p. [Aprovado pelo decreto n.30691 de 29.03.1952, alterado pelo decreto n.2244 de 02.06.1997].
- BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria n. 451, de 19 de set. 1997b. Diário Oficial da União, Brasília, n. 182, de 22 de set. de 1997. Seção 1, p.21005-21012 [A Secretária de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde,...,RESOLVE: Aprovar o Regulamento Técnico Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus Anexos I, II e III.]
- BREER, C., SCHOPFER, K. *Listeria* and food. Lancet, London, v.2, n.8618, p.1022, 1988.

*De acordo com a NBR6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1996.

- BROCKLEHURST, T.F., PARKER, M.L., GUNNING, J.A. COLEMAN, H.P., ROBINS, M.M. Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions. II. Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. J. Appl. Bacteriol., Oxford, v.78, n.6, p.609-615, 1995.
- BUCHANAN, R.L., KLAWITTER, L.A. Effects of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4,5. J. Food Sci., Chicago, v.55, n.6, p.1754-1756, 1990.
- BUCHANAN, R.L., DAMERT, W.G., WHITING, R.C., VAN SCHOTHORST, M. Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. J. Food Prot., Ames, v.60, n.8, p.918-922, 1997.
- CAMPILLO, J.I.G., FERNÁNDEZ, M.C.D., RODRÍGUEZ, J.M.Z. Incidencia de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 en carnes y productos carnicos comercializados en Castilla y Leon. Alimentaria, Madrid, v.37 n.301, p.71-75, 1999.
- CANTONI, C., BALZARETTI, C., VALENTI, M. A case of *Listeria monocytogenes* human infection associated with consumption of cooked meat pork product. Arch. Vet. Ital., Milano, v.40, p.141-142, 1989.
- CARLIER, V., AUGUSTIN, J.C., ROZIER, J. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* (Phagovar 2389/2425/3274/2671/47/108/340): D- and z-values in ham. J. Food Prot., Ames, v.59, n.6, p.588-591, 1996a.
- CARLIER, V., AUGUSTIN, J.C., ROZIER, J. Destruction of *Listeria monocytogenes* during a ham cooking process. J. Food Prot., Ames, v.59, n.6, p.592-595, 1996b.
- CASOLARI, C., FABIO, A. MENZIANI, G., MESSI, P., QUAGLIO, P. Characterization of *Listeria monocytogenes* strain detected in meat and meat products. Ig. Mod., v.101, n.2, p.193-215, 1994.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Georgia. Preventing foodborne illness: Listeriosis. [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/ncidod/publications/brochures/lister.htm> [Dec 16, 1998].

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Georgia. Update: Multistate outbreak of listeriosis. [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r990114.htm> [Mar 17, 1999].

CHUNG, C.L., JEONG, D.K., GU, D.W. Presence of *Listeria* species in market beef. J. Food Prot., Ames, v.58, suppl.16, 1995.

COMI, G., FRIGERIO, R. CANTONI, C. *Listeria monocytogenes* serotypes in Italian meat products. Lett. Appl. Microbiol., Oxford, v.15, p.168-171, 1992.

CONTRERAS, C.J.C., MIYAGUSKU, L., BROMBERG, R., SOUZA, H.E.P. Ocorrência e detecção de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5, Águas de Lindóia, 1998. Resumos. São Paulo: SBM, 1998. p.127.

DALTON, G.B., AUSTIN, C.C., SOBEL, J., HAYES, P.S., BIBB, W.F., GRAVES, L.M. SWAMINATHAN, B., PROCTOR, M.E., GRIFFIN, P.M. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. N. Engl. J. Med., Boston, v.336, n.2, p.100-105, 1997.

DESTRO, M.T., LEITÃO, M.F.F., FARBER, J.M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.62, n.2, p.705-711, 1996.

DESTRO, M.T., SERRANO, A.M. KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. Food Control, Guilford, v.2, n.2, p.110-112, 1991.

DESEO, J. *Listeria monocytogenes* in processed meats. AOAC Int., Arlington, v.3, n.4, p.23-24, 1999.

- DORIS, L.K.Ng, SEAH, H.L. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from a range of foods in Singapore. Food Control, Guildford, v.7, n.4/5, p.171-173, 1996.
- DUFFY, L.L., VANDERLINDE, P.B., GRAU, F.H. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, a_w , nitrite and ascorbate. Int. J. Food Microbiol., Amsterdam v.23, n.3/4, p.377-390, 1994.
- DUGGAN, J., PHILLIPS, C.A. *Listeria* in the domestic environment. Nutr. Food Sci., London, v.213, n.2, p.73-79, 1998.
- FAIN, A.R., LINE, J.E., MORAN, A.B., MARTIN, L.M., LECHOWICH, R.V., CAROSELLA, J.M., BROWN, W.L. Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott A: D-value and z-value determinations in ground beef and turkey. J. Food Prot., v.54, n.7, p.756-761, 1991.
- FARBER, J.M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., v.8, n.3, p.285-291, 1989.
- FARBER, J.M. Current research on *Listeria monocytogenes* in foods: an overview. J. Food Prot., Ames, v.56, n.7, p.640-643, 1993.
- FARBER, J.M., DALEY, E. Presence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally-contaminated meats. Int. J. Food Microbiol., Amsterdam, v.22, n.1, p.33-42, 1994.
- FARBER, J.M., HARWIG, J. The Canadian position on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Food Control, Guildford, v.7, n.4/5, p.253-258, 1996.
- FARBER, J.M., PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev., Washington, v.55, p.476-511, 1991.
- FARBER, J. M., SANDERS, G. W., DUNFIELD, S., PRESCOTT, R. The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. Rev., Oxford, v.6, n.9, p. 181-183, 1989.

- FARBER, J.M., WARBURTON, D.W., BABIUK, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: CANADA. Health and Welfare. Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological analysis of foods. Ottawa: Polyscience, 1994. v.3, 16p. [MFHPB30].
- FENLON, D.R., WILSON, J., DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. J. Appl. Bacteriol., Oxford, v.81, n.6, p.641-650, 1996.
- FERNÁNDEZ, P.S., GEORGE, S.M. SILLS, C.C., PECK, M.W. Predictive model of the effect of CO₂, pH temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., Amsterdam, v.37, n.1, p.37-45, 1997.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Report of the FAO expert consultation on the trade impact of *Listeria* in fish products. Rome: FAO, 1999. 34p. (FAO Fisheries Report., n.604).
- FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. Pathogens reduction and HACCP system and beyond, 1998. [Online]. Available: <http://www.usda.gov/agency/fsis/bkbeyond.htm> [Jun, 12, 1998].
- GLASS, K.A., DOYLE, M.P. Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, v.55, n.6, p.1565-1569, 1989.
- GUANG-HUA, W., MAO-ZHAN, S. The behaviour of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed sliced chinese spiced beef. Fleischwirtsch., Frankfurt, v.77, n.1, p.57-58, 1997.
- GUNASINGHE, C.P.G.L., HENDERSON, C.E., RUTTER, M.A. Comparative study of two plating media (PALCAM and OXFORD) for detection of *Listeria* species in a range of meat products following a variety of enrichment procedures. Lett. Appl. Microbiol., Oxford, v.18, n.1, p.156-158, 1994.

- HARRISON, M.A., SHINEMAN, T.I. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in processed turkey hot dogs. In: IFT ANNUAL MEETING, 1992. Book of abstracts. IFT, 1992. p.21.
- HART, C.D., MEAD, G.D., NORRIS, A.P. Effects of gaseous environment and temperature on the storage behaviour of *Listeria monocytogenes* on chicken breast meat. J. Appl. Bacteriol., Oxford, v.70, n.1, p.40-46, 1991.
- HEISICK, J.E., ROSAS-MARTY, L.I., TATINI, S.R. Enumeration of viable *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* in foods. J. Food Prot., Ames, v.58, n.7, p.733-736, 1995.
- HU, A.C., SHELEF, L.A. Influence of fat content and preservatives on the behavior of *Listeria monocytogenes* in beaker sausage. J. Food Safety, Chicago, v.16, n.3, p.175-181, 1996.
- INGHAM, S.C., ESCUDE, J.M., MCCOWN, P. Comparative growth rates of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on cooked chicken loaf stored under air and two modified atmospheres. J. Food Prot., Ames, v.53, n.4, p.289-291, 1990.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1976. v.1, 371p.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. *Listeria monocytogenes*. In: MICROORGANISMS in foods 5: microbiological specification of food pathogens. London: Chapman & Hall, 1996. p.141-182.
- JACQUET, C., CATIMEL, B., BROSCHE, R., BUCHRIESER, C., DEHAUMONT, P., GOULET, V., LEPOUTRE, V., VEIT, P., ROCOURT, J. Investigations related to the epidemic strains involved in the French listeriosis outbreak in 1992. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, v.61, n.6, p.2242-2246, 1995.
- JAY, J.M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. Food Control, Guildford, v.7, n.4/5, p.209-214, 1996.

- JEONG, D.K., FRANK, J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* at the 10°C in biofilms with microorganisms isolated from milk and dairy processing environments. J. Food Prot., Ames, v.57, n.7, p.576-586, 1994.
- JONES, C.E., SHAMA, G., JONES, D., ROBERTS, I.S., ANDREW, P.W. Physiological and biochemical studies on psychrotolerance in *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Microbiol., Oxford, v.83, n.1, p.31-35, 1997.
- JUNEJA, V.K., SNYDER, O.P., MARMER, B.J.J. Potential for growth form spores of *Bacillus cereus* and *Clostridium botulinum* and vegetative cells of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* serotypes in cooked ground beef during cooling. J. Food Prot., Ames, v.60, n.3, p.272-275, 1997.
- KERR, K., DEALLER, S.F., LACEY, R.W. *Listeria* in cookchill food. Lancet II, London, n.8601, p.37-38, 1988a.
- KERR, K., DEALLER, S.F., LACEY, R.W. Materno-fecal listeriosis from cooked-chill and refrigerated food, Lancet II, London, n.8620, p.1133, 1988b.
- KORSAK, N., DAUGE, G., GHAFIR, Y., CHAHED, A., JOLLY, S., VINDEVOGEL, H. An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine Belgian abattoirs. J. Food Prot., Ames, v.61, n.5, p.535-541, 1998.
- KRÄMER, K.H., BAUMGART, J. Sliced frankfurter-type sausage: inhibiting *Listeria monocytogenes* by means of a modified atmosphere. Fleischwirtsch., Frankfurt, v.73, n.11, p.1279-1280, 1993.
- LINTON, R.H., WEBSTER, J.B., PIERSON, M.D., BISHOP, J.R., HACKNEY, C.R. The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. J. Food Prot., Ames, v.55, n.1, p.84-87, 1992.

- PROMEDMAIL. Listeriosis - France [Online]. Available: http://www.promedmail.org:8080/promed/promed.searchhtml.showmail?p_filename=20000226.863&p_year=2000&p_month=021998. [Fev, 26, 2000]: [Lista de discussão]
- LOU, Y., YOUSEF, A.E. Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. J. Food Prot., Ames, v.59, n.5, p.465-471, 1996.
- MAcCLAIN, D., LEE, W.H. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, v.71, n.3, p.660-664, 1988.
- MACKEY, B.M., PRITCHET, C. NORRIS, A, MEAD, G.C. Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. Lett. Appl. Microbiol., v.10, n.1 p.251-255. 1989
- MADDEN, J.M. Regulatory concerns of *Listeria* in foods. In: IFT ANNUAL MEETING, 1992. Book of abstracts. IFT, 1992. p.102.
- MAÑERU, L., GARCÍA-JALÓN, I. *Listeria monocytogenes* en alimentos disponibles en el mercado de Pamplona. Alimentaria, Madrid, v.33, n.267, p.39-43, 1995.
- McCARTHY, S.A. Incidence and survival of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood products. J. Food Prot., Ames, v.60, n.4, p.372-376, 1997.
- McCLURE, P.J., KELLY, T.M., ROBERTS, T.A. The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., Amsterdam, v.14, n.1, p.77-91, 1991.
- McLAUCHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. Food Control, Guildford v.7, n.4/5, p.187-193, 1996.
- McLAUCHLIN, J. The identification of *Listeria* species. Int. J. Food Microbiol., Amsterdam, v.38, n.1, p.77-81, 1997.

- McLAUCHLIN, J., HALL, S.M., VALANI, S.K., GILBERT, R.J. Human listeriosis and paté: a possible association. Br. Med. J., London, v.303, p.773-775, 1991.
- MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., McCAIG, L.F., BRESEE, J.S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P.M., TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis., Atlanta, v.5, n.5, p.607-625, 1999.
- MEHTA, A., TATINI, S.R. An evaluation of the microbiological safety of reduced-fat cheddar-like cheese. J. Food Prot., Ames, v.57, n.9, p.776-9, 782, 1994.
- MESQUITA, A.J. Bactérias do gênero Listeria em carne e água residuária de lavagem de carcaça de um matadouro frigorífico e em carne bovina moída comercializada na cidade de Goiânia, Goiás. Goiânia, 1991. 142p. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas - USP).
- MILLER, A. J. Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. J. Food Prot., v. 55, n.6, p.414-418, 1992.
- MORENO, P., PLÁ, S., FAGOAGA, F., GARCÍA, M., TORREGROSA, A. Calidad microbiologica de los productos carnicos de las areas de salud de Alcoi y Xativa durante el trienio 1993-1995. Alimentaria, Madrid, v.97, n.282, p.37-41, 1997.
- NOTERMANS, S., DUFRENNE, J., TEUNIS, P., CHACKRABORTY, T. Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot., Ames, v.61, n.2, p.244-248, 1998.
- PARODI, M. MARINO, P., BALZARETTI, C., MAURI, A., CAINARCA, M., CANTONI, C. A case report of sporadic listeriosis related to pork meat in health man. G. Mal. Infett. Parassit., Milano, v.42, n.1, p.115-116, 1990.

- PASSOS, M.H.C.R., KUAYE, A.Y. Influência de gordura, cloreto de sódio e proteína texturizada de soja na inativação térmica de *L. monocytogenes* em hambúrguer. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5, Águas de Lindóia, 1998. Resumos. São Paulo: SBM, 1998. p.140.
- PEELER, J.T., HOUGHTBY, G.A., RAINOSEK, A.P. The most probable number technique. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: APHA, 1992. p.105-120.
- QUINTAVALLA, S., CAPANINI, M. Effect of rising temperature on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat emulsion. Lett. Appl. Microbiol., Oxford, v.12, n.5, p.184-187, 1991.
- QVIST, S., SEHESTED, K., ZEUTHEN, P. Growth supression of *Listeria monocytogenes* in a meat product. Int. J. Food Microbiol., Amsterdam, v.24, n.2, p.283-293, 1994.
- RAINALDI, L., LUCIANI, M.A., PICCONI, F. Behavior of *Listeria* spp. in meat products. Italian J. Food Sci., Roma, v.3, n.4, p.291-296, 1991.
- RIJPENS, N.P., JANNES, G., HERMAN, L.M.F. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken and turkey products determined by polymerase chain reaction and line probe assay hybridization. J. Food Prot., Ames, v.60, n.5, p.548-550, 1997.
- RODRIGUES, D. A. *Listeria* sp e *Listeria monocytogenes* em indústria processadora de nuggets de frango: estudo de ocorrência e avaliação de metodologias de análise. São Paulo, 1999. 104 p. (Tese de Mestrado – Universidade de São Paulo).
- ROCOURT, J. Risks factors for listeriosis. Food Control, Guildford, v.7, n.4/5, p.195-202, 1996.
- ROCOURT, J., COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. eds. Food microbiology fundamental and frontiers. Washington: ASM Press, 1997. p.337-352.

- ROERING, A.M., WIERZBA, R.K., IHNOT, A.M., LUCHANSKY, J.B.
Pasteurization of vacuum-sealed packages of summer sausage inoculated with *Listeria monocytogenes*. J. Food Safety, Westport, v.18, n.1, p.49-56, 1998.
- ROSSO, L., BAJARD, S., FLANDROIS, J.P., LAHELLEC, C., FOURNAUD, J., VEIT, P. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8 degree: consequences for the shelf life of chilled products. J. Food Prot., Ames, v.59, n.9, p.944-949, 1996.
- SCHMIDT, U. Sliced, vacuum-packed frankfurter-type sausage: technological measures to inhibit the growth of listeriae. Fleischwirtsch., Frankfurt, v.75, n.6, p.804-807, 1995.
- SCHMIDT, U., KAYA, M. Behaviour of *L. monocytogenes* in vacuum-packed sliced frankfurter-type sausage. Fleischwirtsch., Frankfurt, v.70, n.11, p.1294-1295, 1990.
- SCHLECH, W.F. Overview of listeriosis. Food Control, Guildford, v.7, n.4/5, p.183-186, 1996.
- SCOTT, V.N. Interaction of factors to control microbial spoilage of refrigerated foods. J. Food Prot., Ames, v.52, n.6, p.431-435, 1989.
- SHANK, F.R., ELLIOT, E.L., WACHSMUTH, I.K., LOSIKOFF, M.E. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. Food Control, Guildford, v.7, n.4/5, p.229-234, 1996.
- SUMNER, S.S., SANDROS, T.M., HARMON, M.C., SCOTT, V.N., BERNARD, D.T. Heat resistance of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. J. Food Sci., v.56, n.12, p.1741-1743, 1991.
- TAPPERO, J.W., SCHUCHAT, A., DEEVER, K.A., MASCOLA, L., WENGER, J.D. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? The listeriosis study group. JAMA J. Am. Med. Assoc., Chicago, v.273, p.1118-1122, 1995.

TOBIA, M.B., MENGONI, G.B., PELION, H.S. *Listeria monocytogenes* e *Listeria* sp em produtos termoprocessados. Rev. Argentina Microbiol., Buenos Aires, v.29, p.109-113, 1997.

VORSTER, S.M., GREEBE, R.P., NORTJÉ, G.L. The incidence of *Listeria* in processed meats in South Africa. J. Food Prot., Ames, v.56, n.2, p.169-172, 1993.

7. ANEXOS:

Anexo 1: Ingredientes empregados à emulsão cárnea para o processamento das mortadelas de primeira linha(TOP) e segunda linha (POP).

Descrição	Formulação TOP	Formulação POP
dianteiro bovino	35 %	12 %
recorte suíno 50%	30 %	8,5 %
gordura suína	3,4 %	4,9 %
miúdos	-	10 %
CMS ^a Aves	-	20 %
toucinho em cubos	16 %	16 %
água/gelo	10 %	10 %
sal	2,6 %	2,6 %
nitrito de sódio	200 ppm	200 ppm
polifosfatos	0,3 %	0,3 %
eritorbato de sódio	0,5 %	0,5 %
condimento	0,2 %	0,2 %
fécula de mandioca	2 %	5 %
PTS ^b Hidratada (1:2)	-	10 %
TOTAL	100 %	100 %

^aCMS: carne mecanicamente separada de aves

^bPTS: proteína texturizada de soja

Anexo 2: Comportamento da temperatura durante o processo de cozimento

Anexo 3: Formulação do Ágar Hemolítico Ceftazidime Cloreto de Lítio (HCLA)

Ágar base:

Columbia ágar.....	39,0 g
Ágar	5,0 g
Cloreto de lítio.....	7,5 g
Citrato férrico amoniacal.....	0,5 g
Colistina.....	11500 UI
Água destilada.....	1000,0 ml

Solução de ceftazidime:

Ceftazidime.....	80,0 mg
Solução tampão fosfato 0,1M pH 7.....	20,0 ml
Esterilizar por filtração.	

Solução tampão fosfato 0,1M pH7:

Preparar uma solução de fosfato de potássio monobásico 0,1M e corrigir o pH para 7 utilizando uma solução de fosfato de potássio dibásico anidro 0,1M.

Autoclavar o ágar base a 121°C por 12 minutos. Resfriar em banho-maria a 50°C. Adicionar 5 ml da solução de ceftazidime (20 mg/l) e homogeneizar cuidadosamente. Distribuir 10ml em placas de petri estéreis. Após solidificação, cobrir com 5 ml de ágar base com ceftazidime adicionado de 4% de sangue desfibrinado de cavalo.