



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOCÊNCIA ANIMAL

Listeria monocytogenes formadoras de biofilmes em presuntos fatiados e sua
sensibilidade aos sanitizantes

JÉSSICA MARTINS DE ANDRADE

RECIFE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOCÊNCIA ANIMAL

JÉSSICA MARTINS DE ANDRADE

Listeria monocytogenes formadoras de biofilmes em presuntos fatiados e sua
sensibilidade aos sanitizantes

Dissertação apresentada ao Programa de
BIOCÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal
Rural de Pernambuco, para obtenção do grau
de Mestre em BIOCÊNCIA ANIMAL.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizabeth Sampaio de
Medeiros

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

A5531 Andrade, Jéssica Martins de.
Listeria monocytogenes formadoras de biofilmes em presuntos
fatiados e sua sensibilidade aos sanitizantes / Jéssica Martins de
Andrade. – Recife, 2018.
43 f.: il.

Orientadora: Elizabeth Sampaio de Medeiros.
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e
Fisiologia Animal, Recife, 2018.

Referencias.

1. Alimentos prontos para consumo
 2. Embutidos
 3. Microrganismos patogênicos
 4. Saúde Única
- I. Medeiros, Elizabeth Sampaio de, orient. II. Título

CDD 636.089

JÉSSICA MARTINS DE ANDRADE

***Listeria monocytogenes* formadoras de biofilmes em presuntos fatiados e sua
sensibilidade aos sanitizantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Elizabeth Sampaio de Medeiros – Orientadora
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Profª Drª Maria Betânia de Queiroz Rolim
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Profª Drª Alda Verônica Souza Livera
Departamento de Nutrição - UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais essa conquista e sempre me dar forças para alcançar meus objetivos.

Aos meus pais Maria de Fátima Andrade e Sebastião Andrade e às minhas tias Márcia Martins e Kátia Martins pelo apoio, carinho e por sempre incentivar meus estudos.

Ao meu namorado Igor Leonardo pelo carinho e por sempre me apoiar e incentivar minhas decisões.

As minhas amigas, Fernanda Moura e Thayná Milena, pela amizade, parceria e apoio nas pesquisas e na vida pessoal.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Elizabeth Sampaio, pelo conhecimento oferecido, apoio, incentivo à pesquisa e amizade.

Aos meus amigos Mariana Lumack e Marcus Falcão pelos conselhos e incentivos.

As companheiras do grupo de pesquisa: Karla, Aila, Ana e Goretti, pelo apoio nas pesquisas.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Inspeção de Carne e Leite do Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE.

Aos meus colegas da Pós-Graduação em Biociência animal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociência animal, pela oportunidade oferecida.

E a todos os meus amigos e familiares me apoiaram e incentivaram.

RESUMO

Listeria monocytogenes é um patógeno relevante nas contaminações de alimentos prontos para consumo, pois é o agente etiológico responsável pela listeriose. Objetivou-se com esse estudo realizar a pesquisa de *L. monocytogenes* em presuntos fatiados e avaliar a sensibilidade aos sanitizantes. Foram adquiridas 40 amostras de presuntos fatiados em supermercados na cidade de Recife - PE, sendo nove provenientes de supermercados de grande porte e 31 de supermercados de médio porte. No isolamento, 25g de cada amostra foi enriquecida em Caldo Demi Fraser e Caldo Fraser e semeadas em Agar Seletivo Listeria segundo Ottaviani e Agosti. A avaliação da capacidade de formação de biofilme e a avaliação dos desinfetantes sobre os biofilmes de *L. monocytogenes* em formação e consolidados *in vitro* foi realizada em placas de microdiluição de poliestireno. Foram utilizados cloro na concentração de 5% e amônia quaternária a 10%. Identificou-se a presença de *L. monocytogenes* em 22,22% (02/09) das amostras adquiridas em supermercados de grande porte da cidade e em 25,8% (08/31) nos supermercados de médio porte. No teste de formação de biofilmes *in vitro*, dois isolados foram capazes de formar biofilme, ambos classificadas como fortes formadores. Nos biofilmes em formação, as duas bactérias apresentaram aderência moderada frente ao cloro e já em relação a amônia quaternária o isolado proveniente do supermercado de grande porte apresentou fraca aderência e o pertencente ao supermercado de médio porte não apresentou aderência. Os biofilmes consolidados apresentaram redução da aderência frente a ambos desinfetantes, obtendo-se com o cloro uma redução de 75,44% e 79,76% nos isolados dos supermercados de grande e médio porte respectivamente. A ação da amônia quaternária frente aos mesmos representou uma diminuição de 64,84% e 66,13% dos biofilmes. A presença de *L. monocytogenes*, principalmente das cepas com capacidade de formar biofilmes, em presuntos fatiados é um fator relevante na saúde única. É necessária uma fiscalização mais rigorosa, nos estabelecimentos, referente a utilização de sanitizantes adequados no processo de higienização, bem como a correta aplicação dos mesmos e a constante educação dos manipuladores de alimentos.

Palavras-chave: Alimentos prontos para consumo; Embutidos; Microrganismos patogênicos; Saúde Única.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a relevant pathogen in contaminations of foods ready-to-eat, as it is the etiological agent responsible for listeriosis. The objective of this study was to investigate *L. monocytogenes* in sliced hams and to evaluate the sensitivity to sanitizers. 40 samples of sliced hams were purchased in supermarkets in the city of Recife - PE, nine from large supermarkets and 31 from medium sized supermarkets. In isolation, 25g of each sample was enriched in Fraser Demi Broth and Fraser Broth and seeded in Listeria Selective Agar according to Ottaviani and Agosti. The evaluation of the biofilm formation capacity and the evaluation of the disinfectants on the biofilms of *L. monocytogenes* in formation and consolidated in vitro was carried out in microdilution plates of polystyrene. Chlorine at 5% concentration and 10% quaternary ammonia were used. The presence of *L. monocytogenes* in 22.22% (02/09) of the samples collected in large supermarkets in the city and 25.8% (08/31) in medium-sized supermarkets was identified. When submitted to the in vitro biofilm formation test, two isolates were able to form biofilm, both classified as strong formers. In the biofilms in formation, treated with the sanitizers, the two bacteria presented moderate adherence to chlorine and already in relation to the quaternary ammonia the isolate coming from the large supermarket had poor adherence and the one belonging to the medium-sized supermarket had no adhesion. The consolidated biofilms presented a reduction in adhesion to both disinfectants, with a reduction of 75.44% and 79.76% in the isolates of large and medium-sized supermarkets, respectively. The action of quaternary ammonia compared to them represented a decrease of 64.84% and 66.13% of biofilms. The presence of *L. monocytogenes*, especially of strains capable of forming biofilms, in sliced hams is a relevant factor in single health. A more rigorous inspection is required in establishments regarding the use of adequate sanitizers in the hygiene process, as well as the correct application of them and the constant education of food handlers.

Key-words: Ready-to-eat food; Embedded; Pathogenic microorganisms; One health.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	08
2. Revisão Bibliográfica	
2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	10
2.2. Biofilmes microbianos.....	13
2.3. Presuntos Suínos.....	17
2.4. Sanitizantes utilizados em estabelecimentos manipuladores de alimentos....	19
3. Objetivo	
3.1. Objetivo Geral.....	21
3.2. Objetivos Específicos.....	21
4. Referências.....	22
5. Artigo.....	28
6. Considerações Finais.....	43

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1. Frequências absoluta e relativa dos resultados, para presença de *L. monocytogenes*, das amostras colhidas em supermercados de grande porte da cidade do Recife – PE. 43

Tabela 2. Frequências absoluta e relativa dos resultados, para presença de *L. monocytogenes*, das amostras colhidas em supermercados de médio porte da cidade do Recife – PE. 43

Tabela 3. Classificação dos isolados de *L. monocytogenes* quanto à capacidade de formar biofilmes e a interferência dos sanitizantes. 43

1. INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por alimentos são caracterizadas como síndromes originadas pela ingestão de alimentos contaminados por microrganismos. Os sintomas, de modo geral, incluem dores abdominais, náuseas, vômitos, diarreia e, em alguns casos, febre. Os sintomas digestivos não são as únicas manifestações, podem haver afecções órgãos, a exemplo dos rins e do fígado e no sistema nervoso central. A duração dos sintomas pode variar de algumas horas até em torno de cinco dias, variação que depende das condições físicas do indivíduo, do tipo de microrganismo ou toxina ingerida e de sua quantidade no alimento (OLIVEIRA et al., 2010; BRASIL, 2017).

Nesse contexto, a *Listeria monocytogenes* destaca-se como um patógeno oportunista causador de uma grave doença transmitida por alimentos, a listeriose. A bactéria foi isolada em diversos alimentos, incluindo frutos do mar, carnes, embutidos e produtos lácteos, no entanto o desenvolvimento da enfermidade está geralmente associada ao consumo de alimentos prontos para consumo contaminados (OXARAN et al., 2017).

Este organismo é de natureza ubiquitária e pode sobreviver e, em diferentes condições, se multiplicar sob situações desfavoráveis, tais como temperaturas de refrigeração (LEONG et al., 2017; WIECZOREK e OSEK, 2017), sendo também considerada mais resistente ao calor, em relação a maioria dos agentes patogênicos não esporulados. Essas características a torna um grande problema na área de segurança de alimentos (BRASILEIRO et al. 2016).

Os ambientes de processamento de alimentos prontos para consumo são reconhecidos como uma fonte considerável de contaminação por *L. monocytogenes*, razão pela qual a bactéria é considerada um grande desafio para os processos de higienização (KOCOT e OLSZEWSKA, 2017), sendo fundamental estabelecer atitudes de monitoramento e controle das possíveis rotas de contaminação cruzada (KOVACEVIC et al., 2012; LEONG et al., 2017). Principalmente na produção de alimentos que são consumidos sem necessidade de tratamento térmico pós-processamento, tais como o presunto (FAI et al., 2011).

Além disso, a capacidade da *L. monocytogenes* de formar biofilmes em superfícies inoxidáveis favorece a colonização persistente nas instalações de

processamento de alimentos (LUO et al., 2017; KOCOT e OLSZEWSKA, 2017; REIS-TEIXEIRA et al., 2017). O biofilme se constitui quando uma associação de células microbianas, juntamente com uma matriz extracelular de material polissacarídico, se adere a uma superfície (MERCIRI, 2006; STEPANOVIC, et al., 2007). Essa estrutura do biofilme confere uma maior proteção para os microrganismos, principalmente nas áreas de difícil limpeza e desinfecção, podendo aumentar a resistência das células bacterianas aos agentes desinfetantes (LEE et al., 2017).

Os sanitizantes são substâncias químicas que possuem ação bactericida ou bacteriostática (BERTIN e MENDES, 2011). Nesse contexto, é importante realizar a escolha dos produtos de limpeza adequados que não comprometam a superfície, a qual precisa ser limpa e que apresentem ação eficiente. (PERACHI et al., 2011).

A realização desse estudo se justifica devido a relevância do microrganismo na saúde pública, sendo importante a identificação de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo, e principalmente de cepas que possuem a capacidade de formar biofilmes, assim como da identificação de sanitizantes capazes de combatê-las quando utilizados na rotina de higienização dos estabelecimentos que manipulam alimentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* é composto por microrganismos anaeróbios facultativos, Gram-positivos que apresenta ampla distribuição em amostras alimentares, ambientais e clínicas (FARBER e PETERKIN, 1991; TAO et al., 2017). Devido a essa condição ubiquitária e à tolerância a severas condições ambientais, a *Listeria* pode contaminar alimentos em múltiplos pontos durante as etapas de fabricação e distribuição. Sua capacidade de crescer também em temperaturas de refrigeração eleva o risco de contaminação dos alimentos refrigerados, sendo os alimentos prontos para consumo, principalmente carne, aves e laticínios veículos para a transmissão (LIU et al., 2015).

É composto pelas espécies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi* (BARANCELLI et al 2011; MCLAUCHLIN et al., 2004; OIE, 2014; LIU et al., 2015), no entanto a *L. monocytogenes* é considerada o principal patógeno de origem alimentar do gênero (JEYALETCHUMI et al, 2010; LIU et al., 2015; KOCOT e OLSZEWSKA, 2017).

L. monocytogenes é um bastonete Gram-positivo pequeno com extremidades arredondadas e não é capaz de produzir esporos ou cápsulas. É móvel, por meio de flagelos, quando cultivada entre 20 e 25° C, no entanto é imóvel ou apresenta motilidade fraca a 37° C (FARBER e PETERKIN, 1991; JEMMI e STPHAN, 2006; JEYALETCHUMI et al, 2010). A temperatura de crescimento varia de 1 a 45°C, mas a faixa ótima está entre 30 a 37°C. São capazes também de suportar repetidos congelamentos e descongelamentos (MANTILLA et al., 2007).

A *L. monocytogenes* foi diferenciada em 13 sorotipos: 1 / 2a, 1 / 2b, 1 / 2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7. Estes foram classificados em cinco sorogrupos: IIa (1 / 2a-3a), IIb (1 / 2b-3b-7), IIc (1 / 2c-3c), IVa (4a-4c) e IVb (4ab-4b, 4d-4e), o entanto apenas quatro sorotipos (1 / 2a, 1 / 2b, 1 / 2c e 4b) são tipicamente isolados de aproximadamente 95% dos casos de listeriose humana. O sorotipo 1 / 2a apresenta maior frequência nas detecções, com presença observada em diversos tipos de alimentos (WIECZOREK e OSEK, 2017).

Sua presença em alimentos prontos para consumo é bastante preocupante, devido as suas características psicrotróficas, resistência à alta concentração de sal e capacidade para sobreviver e crescer em alimentos refrigerados, de forma aeróbica e anaeróbia, em uma ampla gama de pH, que varia de 4,6 a 9,4 (FARBER e PETERKIN, 1991; JEMMI e STPHAN, 2006; JEYALETCHUMI et al, 2010; BRASILEIRO et al. 2016; DU et al., 2017).

A *L. monocytogenes* pode persistir em ambientes de processamento de alimentos constituindo biofilmes, conferindo uma maior resistência aos antimicrobianos e aos estresses ambientais do que na condição de células planctônicas (HENRIQUES e FRAQUEZA, 2017). Os alimentos que são consumidos sem tratamento térmico adicional são as principais fontes de surtos de listeriose. A principal via de contaminação para *L. monocytogenes* é através da contaminação cruzada entre equipamentos e alimentos durante o processamento, pois a bactéria possui a capacidade de persistir em nichos ambientais, como rachaduras em equipamentos, os quais conferem proteção contra a rotina de higienização (CARPENTIER e CERF 2011; MORETRO et al., 2017).

Sua patogenicidade está concentrada em sua habilidade de sobreviver e multiplicar-se em células fagocitárias dos hospedeiros. A *L. monocytogenes* produz protuberâncias nas células adjacentes e entra no citoplasma para repetir o ciclo onde escapa do vacúolo e se multiplica (CRUZ et al., 2008), por ser um patógeno intracelular facultativo, capaz de crescer em macrófagos, células epiteliais e fibroblastos. Todas as cepas virulentas produzem uma hemolisina, a listeriolisina O, que tem relação genética com a estreptomicina O e a pneumolisina. Após a ruptura das membranas dos lisossomas, as enzimas são liberadas e provocam a destruição dos macrófagos e monócitos (MANTILLA et al., 2007).

Caso o sistema imune não seja capaz de controlar de forma eficiente infecção, a multiplicação persiste e a infecção pode atingir a corrente sanguínea e os linfonodos. Após a chegada na corrente sanguínea, a maioria das bactérias atingem o fígado e o baço, onde ocorre a replicação no interior dos macrófagos. Se não houver uma resposta imune eficaz, o microrganismo pode atingir o cérebro e a placenta (VERA et al., 2013).

As manifestações da doença incluem septicemia, meningite ou meningoencefalite e encefalite. Em mulheres grávidas, infecções intrauterinas ou do

colo do útero podem resultar em aborto espontâneo ou natimortos e podendo ser precedida por sinais semelhantes aos da gripe, incluindo febre. É clinicamente definida quando a bactéria é isolada a partir de amostras de sangue, líquido cefalorraquidiano, placenta ou feto (FORSYTHE, 2013; MCLAUCHLIN et al., 2004; OIE, 2014; LEONG et al., 2017).

Desde a segunda metade do século XX, a *L. monocytogenes* emergiu como um importante agente patogênico de origem alimentar (MANTILLA et al., 2007; REBAGLIATI et al, 2009). A listeriose é uma das doenças mais importantes de origem alimentar em seres humanos (FORSYTHE, 2013; MCLAUCHLIN et al., 2004; OIE, 2014). Sua relevância na saúde pública é pouco reconhecida, principalmente porque é uma doença relativamente rara, quando comparada a outras doenças transmitidas por alimentos, como a salmonelose e o botulismo, no entanto, devido à sua elevada taxa de letalidade, ela está entre as causas mais frequentes de mortes por doenças transmitidas por alimentos (FORSYTHE, 2013).

A ocorrência da enfermidade no ser humano, depende de propriedades inerentes ao agente, dentre elas a dose infectante, a virulência da linhagem e, principalmente, de uma população consumidora de alimentos prontos para consumo cada vez mais portadora de fatores de risco predisponentes (BARANCELLI et al 2011). Apresenta um período de incubação longo, que varia de 3 a 70 dias, o que dificulta identificar o agente causador e rastrear a origem da contaminação do alimento (BARANCELLI et al 2011; FORSYTHE, 2013).

Apesar da morbidade da listeriose ser relativamente baixa, a mortalidade da doença sistêmica pode ser elevada, com valores que variam de 20 a 30%. Idosos, mulheres grávidas, recém-nascidos e imunocomprometidos são grupos considerados de alto risco para contrair a doença. (MANTILLA et al., 2007; OIE, 2014; LEONG et al., 2017).

Em casos de meningite listérica, a taxa de mortalidade pode chegar a 70%, já quando causa septicemia a taxa de mortalidade é de 50% e em infecções perinatais-neonatais é acima de 80%. As infecções também podem ocorrer sem a presença de sintomas, resultando na excreção fecal de *L. monocytogenes* (FORSYTHE, 2013). Apresentações mais raras neste grupo, incluem meningoencefalite e encefalite, em

conjunto com as infecções focais, dentre elas endocardite, pneumonia, peritonite e formação de abscessos (MCLAUHLIN et al., 2004).

No Brasil, os casos de listeriose são subdiagnosticados ou subnotificados, no entanto há estudos em relação à prevalência e característica de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de pacientes no país, porém não se estabeleceu alguma relação com a via de transmissão do patógeno (CRUZ et al., 2008). O perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos, no Brasil, ainda é pouco conhecido, principalmente devido à baixa notificação, pois apenas alguns estados e municípios dispõem de estatísticas e dados sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos mais frequentemente implicados, população de maior risco e fatores contribuintes (MARTINS et al., 2011).

No ano de 2015, Food and Drug Administration (FDA) listou mais de 25 casos de alimentos prontos para o consumo devido a contaminação com *L. monocytogenes* nos Estados Unidos (LUCHANESKY et al., 2017). Na maioria dos países da União Europeia, os casos de listeriose são de notificação obrigatória. As infecções por *L. monocytogenes* são comumente relatadas na população idosa na faixa etária entre 64 e 84 anos. De acordo com o Regulamento 2073/2005, a tolerância permitida de um valor menor ou igual a 100 unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) aplica-se durante toda a vida de prateleira dos alimentos no mercado (European Food Safety Authority, 2015). Já nos Estados Unidos da América, os padrões estabelecidos para *L. monocytogenes*, em produtos prontos para consumo, é que esteja ausente em 25 g do alimento (MENA et al., 2004).

No entanto, a legislação brasileira ainda não possui padrões oficiais em relação à presença e disseminação de *L. monocytogenes* em carnes e produtos cárneos, fator que dificulta a fiscalização da qualidade desses produtos em estabelecimentos varejistas (FAI, et al., 2011).

2.2. Biofilmes microbianos

Na natureza e nos alimentos, microrganismos são capazes de se aderirem às superfícies, formando os biofilmes. A superfície, inicialmente, é condicionada à adsorção de moléculas orgânicas e em seguida ocorre a colonização bacteriana.

Superfícies rugosas proporcionam condições para colonização, protegendo o microrganismo da remoção mecânica (FORSYTHE, 2013).

É comum, na indústria de alimentos, a presença de biofilmes e representa uma preocupação, já que as bactérias podem aderir a diversos tipos de superfície, tais como plástico, partículas de metal e de vidro, solo, madeira e alimentos. A fixação das bactérias aos produtos alimentícios ou em superfícies de contato com esses produtos leva a perdas econômicas, além de um maior risco da ocorrência de doenças transmitidas por alimentos. Biofilmes bacterianos conferem vantagens para que seus membros possam sobreviver, uma vez que são protegidos contra condições desfavoráveis ambientais, tal como a luz ultravioleta, desidratação, ao tratamento antimicrobiano e desinfetantes, tornando sua eliminação um significativo desafio. Entretanto, podem ter ação benéfica para a indústria alimentar e pode ser utilizado para aplicações biotecnológicas, a exemplo da produção de alimentos fermentados e no tratamento de resíduos (WINKELSTROTER et al., 2014).

Os biofilmes microbianos podem ser definidos como comunidades formadas por células sésseis, aderidas a substratos bióticos e abióticos e embebidas por material extracelular formado de polímeros de exopolissacarídeos (KUMAR E ANAND, 1998; BOARI, 2008; KASNOWSKI et. al., 2010; KOCOT e OLSZEWSK, 2017; PILCHOVA et al., 2014; POULSEN, 1999; OLIVEIRA et al., 2010; WINKELSTROTER et al., 2014). É composto por partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, que formam uma superfície denominada matriz, abaixo dela os microrganismos continuam a crescer, formando um cultivo puro ou uma associação com outros microrganismos e aumentando assim a proteção contra agressões químicas e físicas (KASNOWSKI et. al., 2010; KUMAR E ANAND, 1998). Podem conter tanto bactérias patogênicas quanto deteriorantes, elevando o risco de contaminação microbiológica do produto final. Células aderidas nos biofilmes podem aumentar a resistência à biocidas e ao tratamento térmico (FORSYTHE, 2013).

Quando composto por várias camadas de células, pode apresentar canais que possibilitam o fluxo de líquido e gases, a dispersão de nutrientes e o descarte de componentes. Nos ambientes naturais, em torno de 95% a 99% dos microrganismos existem na forma de biofilmes, podendo ser encontrados em quase todos os substratos que possuam um nível de umidade suficiente para suportar seu

crescimento. Nesse contexto, a forma de vida bacteriana livre ou planctônica pode ser observada apenas como um meio de translocação entre superfícies (OLIVEIRA et al., 2010).

O primeiro relato publicado referente a biofilmes de bactérias de origem alimentar descreveu as propriedades de fixação da *Salmonella sp.* E, desde então, muitas bactérias têm sido identificadas na formação de biofilmes nas instalações de indústrias alimentares, dentre elas *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus spp.* e *Escherichia coli* O157: H7 (WINKELSTROTER et al., 2014).

Na formação dos biofilmes, a primeira etapa é caracterizada pela adsorção de moléculas orgânicas ou inorgânicas à superfície, formando o filme condicionante. Os resíduos proteicos, lipídicos e de carboidratos, provenientes de produtos derivados do leite ou de carnes, são elementos importantes na formação da camada condicionante. Esses resíduos, aderidos aos equipamentos e utensílios, são considerados fontes potenciais de contaminação. Em seguida, ocorre a fixação de células livres oriundas do meio líquido, nas superfícies sólidas, minutos após o transporte e a adsorção de substâncias orgânicas e inorgânicas dissolvidas no meio aquoso. Os microrganismos, em seu estilo de vida planctônico, recebem um estímulo para que ocorra a aderência em uma superfície (OLIVEIRA et al., 2010; KOCOT e OLSZEWSK, 2017).

A camada de nutrientes afeta as propriedades físico-químicas da superfície, a exemplo da energia livre da superfície, mudanças na hidrofobicidade e cargas eletrostáticas, favorecendo a colonização (FORSYTHE, 2013). Para que ocorra a adesão devem haver forças atrativas, entre a célula e a superfície, mais fortes que as repulsivas (KASNOWSKI et. al., 2010). Inicialmente, a adesão é reversível através das forças de atração de Van Der Waals, forças eletrostáticas e forças de interação hidrofóbicas e mais adiante reversível pelas interações dipolo-dipolo, ligações covalentes e iônicas e interações hidrofóbicas. Os flagelos bacterianos, as fímbrias e os exopolissacarídeos estão envolvidos no contato com filmes condicionantes. O exopolissacarídeo é fundamental da adesão célula-célula e célula-superfície, protegendo contra a desidratação (KOCOT E OLSZEWSK, 2017). Bactérias aderidas de forma irreversível se multiplicam, formando microcolônias. Durante essa fase, as células produzem um maior número de polímeros adicionais que aumentam sua

fixação, possibilitando uma estabilização da colônia contra flutuações do ambiente (FORSYTHE, 2013).

A camada de biofilme pode, em poucos dias, apresentar vários milímetros de espessura. A formação do biofilme maduro ocorre num período de 3 a 6 dias após a adesão inicial, podendo chegar a 10 dias. A maturidade acontece, principalmente, devido ao aumento da densidade populacional, além da pronunciada produção e deposição de polímeros extracelulares que aumenta a espessura do biofilme (KASNOWSKI et. al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

Ao longo do tempo, o biofilme tende a se desfazer, o que possibilita a descamação de partículas de biomassa. As bactérias presentes nas áreas que descamaram podem contaminar o alimento ou dar início à formação de um novo biofilme (FORSYTHE, 2013; KASNOWSKI et. al., 2010). Há três processos de dispersão, a expansiva, quando parte das células de uma microcolônia sofre lise e outra retoma a motilidade e são liberadas da estrutura, a fragmentação, onde porções de matriz extracelular associadas a microrganismos são liberadas, e a superficial, a qual se dá pelo crescimento do próprio biofilme (KASNOWSKI et. al., 2010).

A dispersão ocorre devido a mecanismos ativos ou passivos. Os ativos estão associados à presença de estruturas bacterianas ou com a produção de substâncias extracelulares. Os passivos são mediados por forças externas, sendo elas de cisalhamento ou erosão, referente à eliminação contínua de células individuais ou em pequenos grupos, em baixos níveis, durante os últimos estágios da formação do biofilme e de abrasão, que está relacionada ao desprendimento devido a colisão de partículas sólidas com o biofilme. No entanto, a dispersão pode ser induzida pela intervenção humana através de meios químicos, físicos e remoção biológica e também por relações entre espécies, como competição, mutualismo, predação ou parasitismo (WINKELSTROTTER et al., 2014).

Na indústria de alimentos, os biofilmes são capazes de se acumular em uma variedade de substratos, a exemplo do aço inox, vidro, borracha, polipropileno, fórmica, ferro, polietileno de baixa densidade e policarbonato. É válido ressaltar que o biofilme, quando submetido ao calor, pode cristalizar e formar depósitos ou crostas muito aderentes, favorecendo a proteção de novos microrganismos e dificultando ainda mais a eficácia da higienização (KASNOWSKI et. al., 2010).

Os microrganismos formadores de biofilmes podem causar danos e deterioração aos alimentos, gerando alterações na aparência, odor, cor e sabor. Além de propiciarem espaço e condições para a proliferação de microrganismos, podem gerar a corrosão das superfícies de equipamentos, reduzindo sua vida útil, por outro lado, a formação de biofilmes microbianos, dependendo das espécies, podem até proteger a superfície de corrosão (BOARI, 2008; KASNOWSKI et. al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; SHI e ZHU, 2009).

Biofilmes compostos por bactérias patogênicas, como a *L. monocytogenes*, geram graves danos na indústria de alimentos, principalmente porque os mecanismos de sobrevivência ainda não foram totalmente elucidados, porém foi identificado que os flagelos, proteínas associadas ao biofilme e a comunicação célula-célula possuem um papel significativo no processo de formação de biofilmes pela *L. monocytogenes* (KOCOT e OLSZEWSK, 2017).

Uma medida eficaz para prevenir a formação de biofilmes microbianos é a aplicação de procedimentos operacionais de higienização eficientes (KASNOWSKI et. al., 2010; SHI e ZHU, 2009). A higienização adequada dos equipamentos e a higiene pessoal do manipulador, no processamento de alimentos prontos para consumo, é de fundamental importância. Bem como um *desing* adequado dos equipamentos, já que a microtopografia da superfície pode dificultar a limpeza, pois fendas e imperfeições podem proteger células aderidas. (FORSYTHE, 2013).

2.3. Presuntos Suínos

No período entre 2007 e 2017, no Brasil, o Ministério da Saúde registrou 7170 surtos de doenças transmitidas por alimentos, no entanto destes 70,6% não tiveram o agente identificado e em 57,1% dos casos não identificação do alimento causador. Os produtos cárneos e derivados foram confirmados em 2,1% dos surtos (BRASIL, 2017).

A maioria dos surtos alimentares é resultado da associação entre a ingestão de alimentos contaminados pela manipulação inadequada e conservação ou distribuição em condições impróprias. Algumas bactérias, como *L. monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7, apresentam doses infectantes com valores muito baixos, permitindo que haja infecção se não houver outra etapa pós-processamento que elimine esses microrganismos (OLIVEIRA et. al., 2010).

Nesse contexto, um aspecto importante a ser considerado é a salubridade dos alimentos, pois a população vem apresentando mudanças nos hábitos alimentares, fator que gera uma crescente preferência por alimentos prontos para consumo. Sabe-se que a maioria dos agentes patogênicos são destruídos por tratamentos térmicos, entretanto os alimentos prontos para consumo não necessitam ser reaquecidos pelo consumidor, aumentando o risco da ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (MARTINS et al., 2011; BRASILEIRO et al. 2016).

Há uma crescente preocupação quanto à importância de produtos cárneos derivados de suínos como possíveis veiculadores de *L. monocytogenes*, (FAI et al., 2011; GAMBOA-MARIN et al., 2012). A presença do agente patogênico, em suínos, está associado ao fato que estes animais são transportadores de *L. monocytogenes*, pois foi demonstrado que a carne suína é capaz de alojar esta bactéria em tonsilas e no intestino. Assim, se durante a evisceração há ruptura de órgãos, a carcaça pode ser contaminada (GAMBOA-MARIN et al., 2012).

No último trimestre de 2016, 10,81 milhões de cabeças de suínos foram abatidas, valor que representa aumentos de 0,8% em relação ao trimestre anterior e de 5,8% em relação ao mesmo período de 2015. Este resultado é considerado um recorde desde o ano de 1997, quando iniciaram as pesquisas na área. No total em 2016 foram abatidas 42,32 milhões de cabeças de suínos, que caracteriza um aumento de 7,8% em relação ao ano de 2015 (IBGE, 2017).

Na produção de embutidos, destaca-se o uso da carne suína. As carnes utilizadas no preparo devem ser livres de aponeuroses, de resíduos de sangue e sujidades, sendo conservadas em baixa temperatura. (ROCCO, 1996). O presunto é o produto cárneo industrializado obtido exclusivamente com o pernil de suínos, desossado, adicionado de ingredientes, e submetido a um processo de cozimento adequado (BRASIL, 2000). Caracteriza-se por apresentar mínimo de 14% de proteína bruta, pH entre 5,9 e 6,1 e atividade de água na faixa de 0,91 a 0,97, parâmetros que tornam esse produto bastante susceptível à contaminação bacteriana (FAI et al., 2011).

No preparo de produtos fatiados prontos para consumo, tais como presunto suíno, uma máquina fatiadora de frios é comumente utilizada como último passo do processo, seguido da embalagem do produto. São itens que se encontram disponíveis na seção de alimentos refrigerados dos supermercados, fornecidos por indústrias que

produzem em maior escala ou fatiados na própria loja, o que os torna mais populares com grande demanda (SHEEN, 2008). Em estabelecimento varejistas, a ocorrência de agente patogênicos, como a *L. monocytogenes*, em produtos cárneos prontos para consumo, foi associada com contaminação cruzada durante as operações pós-processamento (BRASILEIRO et al. 2016).

O processo de fatiar esses produtos, que não sofrerão um posterior tratamento térmico, é considerado uma importante etapa no monitoramento da contaminação por *L. monocytogenes* durante a produção (SHEEN, 2008). Sakate et al., 2003 em suas 45 amostras analisadas de salame, identificaram três que apresentaram populações de *L. monocytogenes*, sendo duas pertencentes ao sorotipo 1/2a e uma ao 1/2b. Em estudos realizados na Nova Zelândia sobre o risco microbiológico da *L. monocytogenes*, em patê, pastas de carne e embutidos cárneos foram considerados os maiores riscos relativos no grupo de produtos prontos para consumo (FORSYTHE, 2013).

2.4. Sanitizantes utilizados em estabelecimentos manipuladores de alimentos

A sanitização é a etapa do processo de higienização que corresponde ao conjunto de procedimentos realizados para garantir condições ideais de higiene do estabelecimento e do processo. Dentre os grupos de sanitizantes, pode-se destacar o cloro e seus derivados e os quaternários de amônia (BERTIN e MENDES, 2011).

Desinfetantes à base de cloro, principalmente o hipoclorito de sódio, são bastante utilizados na indústria de alimentos, devido ao seu amplo espectro contra bactérias, alta eficácia e baixo custo (SILVA et al., 2017; HENRIQUES e FRAQUEZA, 2017). Possui ação capaz de destruir a cápsula bacteriana de proteção e oxidação do protoplasma celular. Também formam cloraminas tóxicas, as quais alteram a permeabilidade celular e, dessa forma, comprometem a regeneração enzimática (NASCIMENTO et al., 2010).

Além do cloro, a amônia quaternária também pode ser aplicada, por ser um tenso ativo catiônico eficaz contra diversos patógenos (HENRIQUES e FRAQUEZA, 2017). Sua ação ocorre quando entra em contato com membrana celular dos microrganismos, pois possui a capacidade de alterar a permeabilidade da mesma,

devido ao estímulo da glicólise e assim acarretando um esgotamento celular (NASCIMENTO et al., 2010).

Um sanitizante ideal deve atender a alguns requisitos, sendo eles: não ser corrosivo aos equipamentos, não ser tóxico, ter enxágue fácil, possuir uma ação rápida, ser econômico e ter condição para ser armazenado. Nesse contexto, devem ser avaliadas as vantagens e desvantagens de utilização antes da escolha do produto (NASCIMENTO et al., 2010).

Antes da aplicação do sanitizante, é essencial conhecer sua função, concentração efetiva, modo de ação e a forma como devem ser usados, para otimizar sua aplicação e obter um efeito satisfatório com uma quantidade mínima (SILVA et al., 2017). As células bacterianas podem apresentar sensibilidades diferentes a uma determinada concentração bactericida. Bem como o desenvolvimento da resposta adaptativa por células de biofilme como resultado de uso excessivo do desinfetante (OLSZEWSKA, et al., 2016).

Os desinfetantes de uso já consolidado na indústria alimentícia apresentam, de modo geral, ação satisfatória contra microrganismos na forma planctônica, no entanto em biofilme pode haver uma alteração a resposta dos mesmos (OLSZEWSKA, et al., 2016; HENRIQUES e FRAQUEZA, 2017). Além disso, podem restar resíduos das sujidades, onde os microrganismos poderão continuar o seu desenvolvimento, favorecendo a formação dos biofilmes microbianos (NASCIMENTO et al., 2010; PERACHI et. al., 2011). Também é importante considerar que a atividade germicida do produto está relacionada com algumas condições, dentre elas as variáveis físico-químicas dos sanitizantes, tempo em contato com a superfície, tipo de superfície, espécie e concentração dos microrganismos presentes (NASCIMENTO et al., 2010).

Para microrganismos como *L. monocytogenes*, fatores tais como temperatura, dureza da água, características da superfície e resíduos de alimentos dificultam a eficácia dos procedimentos de sanitização, fornecendo condições para a geração de uma fonte potencial de contaminação aos alimentos (BOLOCAN et al., 2016).

Portanto, é importante realizar o monitoramento do procedimento de desinfecção para identificar se o mesmo foi realizado de forma satisfatória. As formas utilizadas envolvem a avaliação visual, avaliação do cumprimento das etapas e procedimentos previamente estabelecidos e avaliação da carga microbiana, através de análises laboratoriais (BERTIN e MENDES, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Realizar a pesquisa de *Listeria monocytogenes* formadoras de biofilmes em presuntos fatiados e avaliar sua sensibilidade aos sanitizantes.

3.2. Específicos

- Avaliar a ocorrência de *L. monocytogenes* em amostras de presuntos fatiados;
- Determinar a capacidade da *L. monocytogenes* produzir biofilmes *in vitro*;
- Testar a sensibilidade de amostras de *L. monocitogenes*, que apresentaram capacidade de formar biofilmes, frente a ação de sanitizantes.

4. REFERÊNCIAS

BARANCELLI, G. V.; SILVA-CRUZ, J. V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.1, p.155-168, 2011.

BERTIN, B.; MENDES, F. **Segurança de alimentos no comércio: atacado e varejo**. Rio de Janeiro: Senac Nacional, 2011.

BOARI, C. A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophyla* e *Staphylococcus Aureus* sob diferentes condições de cultivo**. 2008. 94 f. Tese (Doutorado em ciência dos alimentos) – Universidade Federal de Lavras.

BOLOCAN, A. S.; NICOLAU, A. I.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; BORDA, D.; ONICIUC, E. A.; STESSL, B.; GURGU, L.; WAGNER, M.; JORDAN, K. Dynamics of *Listeria monocytogenes* colonisation in a newly-opened meat processing facility. **Meat Science**, v.113, p.26–34, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 20, de 31 de julho de 2000. Aprovar os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de almôndega, de apresuntado, de fiambre, de hambúrguer, de kibe, de presunto cozido e de presunto. **Diário Oficial da União**, 03 de agosto de 2000, seção 1, página 7.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. 2017. Disponível em: <
<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/.../Apresentacao-Surtos-DTA2017.pdf>>. Acesso em: 12. jul. 2017.

BRASILEIRO, I. S.; BARBOSA, M.; IGARASHI, M. C.; BISCOLA, V.; MAFFEI, D. F.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Use of growth inhibitors for control of *Listeria monocytogenes* in heat-processed ready-to-eat meat products simulating post-processing contamination. **Food Science and Technology**, v.74, p.7-13, 2016.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, n.145, p.1-8, 2011.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.2, p.195-206, 2008.

DU, X.; ZHANG, X.; WANG, X.; SU, Y.; PING LI, P.; WANG, S. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* in Chinese food obtained from the central area of China. **Food Control**, v.74, p.9-16, 2017.

FAI, A. E. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; VERDIN, S. E. F.; PINHEIRO, N. M. S.; BRAGA, A. R. C.; STAMFORD, T. L. M. *Salmonella sp.* and *Listeria monocytogenes* in fully

cooked ham commercialized in supermarkets of Fortaleza (CE, BRASIL): risk factor for public health. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, n.2, p.657-662, 2011.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v.55, n.4 p. 476 – 511, 1991.

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

GAMBOA-MARIN, A.; BULTRAGO, S.; PEREZ-PEREZ, K.; MERCADO, M.; POUTOU-PINALES, R.; CARRASCAL-CAMACHO, A. Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en carnes y derivados de la industria porcícola colombiana. **Revista MVZ Córdoba**, v.17, n.1, p.2827-2833, 2012.

HENRIQUES, A. R.; FRAQUEZA, M. J. Biofilm-forming ability and biocide susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the ready-to-eat meat-based food products food chain. **Food Science and Technology**, v.81, p.180-187, 2017.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE, Estatística da Produção Pecuária 2017. Rio de Janeiro: MPOG, 2017.

JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: foods-borne pathogen and hygiene indicator. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v.25, n.2, p.571-80, 2006.

JEYALETCHUMI, P.; TUNUNG, R.; MARGARET, S. P.; SON, R.; FARINAZLEEN, M. G.; CHEAH, Y. K. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **International Food Research Journal**, v.17, p.1-11, 2010.

KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.3, n.15, 2010.

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

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

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.9-27, 1998.

LEONG, D.; NICAOGÁIN, K.; LUQUE-SASTRE, L.; MCMANAMON, O.; HUNT, K.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; SCOLLARD, J.; SCHMALENBERGER, A.; FANNING, S.; O'BYRNE, C.; JORDAN, K. A 3-year multi-food study of the presence and persistence

of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, v.249, p.18–26, 2017.

LIU, H.; LU, L.; PAN, Y.; SUN, X.; HWANG, C. ZHAO, Y.; WU, V. Rapid detection and differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species in deli meats by a new multiplex PCR method. **Food Control**, v.52, p.78-84, 2015.

LUCHANSKY, J. B.; CHEN, Y.; PORTO-FETT, A. C. S.; POUILLOT, R.; SHOYER, B. A.; JOHNSON-DERYCKE, R.; EBLEN, D. R.; HOELZER, K.; SHAW, JR., W. K.; VAN DOREN, J. M.; CATLIN, M.; LEE, J.; TIKEKAR, R.; GALLAGHER, D.; LINDSAY, J. A.; Survey for *Listeria monocytogenes* in and on Ready-to-Eat Foods from Retail Establishments in the United States (2010 through 2013): Assessing Potential Changes of Pathogen Prevalence and Levels in a Decade. **Journal of Food Protection**, v.80, n.6, p.903–921, 2017.

LUO, L.; ZHANG, Z.; HONG WANG, H.; WANG, P.; LAN, R.; DENG, J.; MIAO, Y.; WANG, Y.; WANG, Y.; XU, J.; ZHANG, L.; SUN, S.; LIU, X. ZHOU, Y.; CHEN, X.; LI, Q.; YE, C. A 12-month longitudinal study of *Listeria monocytogenes* contamination and persistence in pork retail markets in China. **Food Control**, v.76, p.66-73, 2017.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; SANTOS, E. B.; GOUVÊA, R. Importância da *listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.14, n.1, p.180-192, 2007.

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

MCLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R. T.; SMERDON, W. J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, p.15– 33, 2004.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, v.21, p.213–216, 2004.

MERCURI L; G. Microbial Biofilms: A Potential Source for Alloplastic Device Failure. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.64, n.8, p.1303-1309, 2006.

MORETRO, T.; SCHIRMER, B. C. T.; HEIR, E.; FAGERLUND, A.; HJEMLI, P.; LANGSRUD, S. Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. **International Journal of Food Microbiology**, v.241, p.15–224, 2017.

NASCIMENTO, H. M.; DELGADO, D. A.; BARBARIC, I. F. **Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do** crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**, v.2, n.1, p.11-13, 2010.

OIE, **Chapter 2.9.7. *Listeria monocytogenes***. OIE Terrestrial Manual, p. 1 – 18, 2014.

OLIVEIRA, M. M. M. BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.3, p.277-84, 2010.

OLIVEIRA, A. B. A.; PAULA, C. M. D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M. R. I.; TONDO, E. C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, v.30 n.3, p.279-285, 2010.

OLSZEWSKA, M. A.; ZHAO, T.; DOYLE, M. P. Inactivation and induction of sublethal injury of *Listeria monocytogenes* in biofilm treated with various sanitizers. **Food Control**, v.70, p371-379, 2016.

OXARAN, V.; IN LEE, S. H.; CHAUL, L. T.; CORASSIN, C. H.; BARANCELLI, G. V.; ALVES, V. F.; CARLOS OLIVEIRA, A. F.; GRAM, L.; MARTINIS, E. C. P. *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. **Food Microbiology**, v.68, p.16-23, 2017.

PERACHI, J.; CAVALLERI, R.; SOUZA, C. F. V. Monitoramento da higienização de facas e tesouras utilizadas na desossa de frangos em um frigorífico do Vale do Taquari/RS. **Interbio**, v.5, n.2, p. 56-61, 2011.

PILCHOVA T.; HERNOULD, M.; PRÉVOST, H.; DEMNEROVA, K.; PAZLAROVA, J; TRESSE, O. Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.35, p.366-372, 2014.

POULSEN, L. V. Microbial Biofilm in Food Processing. **Food Science and Technology Journal**, v.32, p.321-326, 1999.

REBAGLIATI, V.; PHILIPPI, R.; ROSSI, M.; TRONCOSO, A. Prevention of foodborne listeriosis. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v.52, n.2, p.145, 2009.

REIS-TEIXEIRA, F. B.; ALVES, V. F.; MARTINIS, E. C. P. Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. **Brazilian journal of microbiology**, v.48, p.587–591, 2017.

ROCCO, S. C. **Embutidos, frios e defumados**. 1 ed. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996.

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

SILVA, D. A. L.; CAMARGO, A. C.; TODOROV, S. D.; NERO, L. A. *Listeria* spp. contamination in a butcher shop environment and *Listeria monocytogenes* adhesion ability and sensitivity to food-contact surface sanitizers. **Journal of Food Safety**, v.37, n.2, p.1-8, 2017.

SHEEN S. Modeling Surface Transfer of *Listeria monocytogenes* on Salami during Slicing. **Journal of Food Science**, v.73, n.6, 2008.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v.20, p.407-413, 2009.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; IRKOVIC, I. C.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.115 p.891–899, 2007.

TAO, T.; CHEN Q.; BIE, X.; LU, F.; LU, Z. Investigation on prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in animal-derived foods by multiplex PCR assay targeting novel genes. **Food Control**, V.73, p.704-711, 2017.

VERA, A.; GONZÁLEZ, G.; DOMÍNGUEZ, M.; BELLO, H. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. **Revista Chilena de Infectología**, v.30, n.4, p.407-416, 2013.

WIECZOREK, K.; JACEK OSEK, J. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and smoked fish in Poland. **Food Microbiology**, v.64, p;164-171, 2017.

WINKELSTROTER, L. K.; TEIXEIRA, F. B. R.; SILVA, E. P.; ALVES, V. F.; MARTINIS, E. C. P. Unraveling Microbial Biofilms of Importance for Food Microbiology. **Microbial Ecology**, v.68, p.35-46, 2014.

5. ARTIGO

***Listeria monocytogenes* formadoras de biofilmes em presuntos fatiados e sua
sensibilidade aos sanitizantes**

(A ser submetido ao periódico Ciência Rural - Qualis B1)

***Listeria monocytogenes* formadoras de biofilmes em presuntos fatiados e sua
sensibilidade aos sanitizantes**

RESUMO

Listeria monocytogenes é um patógeno relevante nas contaminações de alimentos prontos para consumo, pois é o agente etiológico responsável pela listeriose. Objetivou-se com esse estudo realizar a pesquisa de *L. monocytogenes* em presuntos fatiados e avaliar a sensibilidade aos sanitizantes. Foram adquiridas 40 amostras de presuntos fatiados em supermercados na cidade de Recife - PE, sendo nove provenientes de supermercados de grande porte e 31 de supermercados de médio porte. No isolamento, 25g de cada amostra foi enriquecida em Caldo Demi Fraser e Caldo Fraser e semeadas em Agar Seletivo Listeria segundo Ottaviani e Agosti. A avaliação da capacidade de formação de biofilme e a avaliação dos desinfetantes sobre os biofilmes de *L. monocytogenes* em formação e consolidados *in vitro* foi realizada em placas de microdiluição de poliestireno. Foram utilizados cloro na concentração de 5% e amônia quaternária a 10%. Identificou-se a presença de *L. monocytogenes* em 22,22% (02/09) das amostras adquiridas em supermercados de grande porte da cidade e em 25,8% (08/31) nos supermercados de médio porte. No teste de formação de biofilmes *in vitro*, dois isolados foram capazes de formar biofilme, ambos classificadas como fortes formadores. Nos biofilmes em formação, as duas bactérias apresentaram aderência moderada frente ao cloro e já em relação a amônia quaternária o isolado proveniente do supermercado de grande porte apresentou fraca aderência e o pertencente ao supermercado de médio porte não apresentou aderência. Os biofilmes consolidados apresentaram redução da aderência frente a ambos desinfetantes, obtendo-se com o cloro uma redução de 75,44% e 79,76% nos isolados dos supermercados de grande e médio porte respectivamente. A ação da amônia quaternária frente aos mesmos representou uma diminuição de 64,84% e 66,13% dos biofilmes. A presença de *L.*

monocytogenes, principalmente das cepas com capacidade de formar biofilmes, em presuntos fatiados é um fator relevante na saúde única. É necessária uma fiscalização mais rigorosa, nos estabelecimentos, referente a utilização de sanitizantes adequados no processo de higienização, bem como a correta aplicação dos mesmos e a constante educação dos manipuladores de alimentos.

Palavras-chave: Alimentos prontos para consumo; Embutidos Microrganismos patogênicos; Saúde Única.

INTRODUÇÃO

O crescimento da demanda de produtos cárneos industrializados, refrigerados e prontos para o consumo, vem contribuindo para a elevação do risco de doenças transmitidas por alimentos, aumentando a possibilidade de contaminação cruzada durante as etapas pós-processamento (FAI, et al., 2011; WANG, et al, 2016; LEONG et al., 2017).

Listeria monocytogenes é um patógeno de destaque nessas contaminações, pois é o agente etiológico responsável pela listeriose, enfermidade de baixa incidência, porém uma alta taxa de mortalidade (LIU et al., 2015; LUCHANSKY et al., 2017; LUO et al., 2017). A manifestação pode ser invasiva, podendo levar à septicemia e meningite ou não invasiva, cujo quadro clínico de gastroenterite vem acompanhado de febre e vômitos (IACUMIN et al., 2016).

A *L. monocytogenes* é ubiqüitária, sendo encontrada em diversos ambientes, como o solo, a água, animais e seres humanos, fator que torna difícil sua eliminação do ambiente de processamento de alimentos (IACUMIN et al., 2016; LEONG et al., 2017). Além disso, a *L. monocytogenes* é capaz de formar biofilmes em superfícies bióticas ou abióticas, incluindo os ambientes de processamento de alimentos. Esse biofilme é composto por exopolissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos e, após sua consolidação, torna-se mais difícil de ser removido (LI et al., 2018).

Como medidas de prevenção e controle, desinfetantes químicos são adotados na higienização das superfícies que entram em contato com alimentos, visando a eliminação dos microrganismos (BELTRAME et al., 2015). Compostos a base de cloro e amônia quaternária são frequentemente empregados, devido à facilidade de aplicação e baixo custo (SILVA et al., 2017). Objetivou-se com esse trabalho realizar a pesquisa de *L. monocytogenes* em presuntos fatiados em supermercados da cidade do Recife-PE e a avaliar sua sensibilidade aos sanitizantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridas 40 amostras de presuntos fatiados, em estabelecimentos varejistas na cidade de Recife-PE, sendo uma amostra obtida por estabelecimento. Nove amostras foram provenientes de supermercados de grande porte e 31 de supermercados de médio porte. Elas estavam dentro do prazo de validade estabelecido nas etiquetas pelo local que as manipulou e embalou. As amostras foram acondicionadas e transportadas, em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, para o laboratório onde se realizou as análises.

Para o isolamento, se utilizou 25g por amostra de presunto e o método aplicado foi o ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004, com adaptações, as quais incluem a semeadura por esgotamento em placas de Petri contendo ágar Chromocult Listeria Seletivo de acordo com Ottaviani e Agosti - ALOA (Merck®), suplementado com 5mg de Anfotericina B (Laboratório Cristália) e 10mg de Ceftazidima (Antibióticos do Brasil - ABL).

As colônias que apresentaram características sugestivas de *L. monocytogenes* foram identificadas através de suas características morfo-tintoriais e bioquímicas. A coloração de Gram e os testes de motilidade em meio SIM, catalase e CAMP foram realizados de acordo com Barrow e Feltham, 1993. O teste de β -hemólise foi executado conforme Pagotto et al., 2001. Utilizou-se como controle positivo de *L. monocytogenes* a cepa American Type Culture

Collection, fornecida pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (ATCC® 19115™).

Para a avaliação da produção de biofilme, foi utilizada a metodologia segundo Rodrigues et al. (2010), com adaptações, onde colônias isoladas de *L. monocytogenes* foram inoculadas em tubos contendo 3mL de Caldo Triptona Soja (Himedia®) até turvação 0.5 de MacFarland e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após esta etapa, 100µl da solução foram inoculados em placas de microdiluição de 96 poços e seguiu-se a incubação a 37°C por 24 horas. Em seguida, o conteúdo de cada poço foi aspirado e estes foram lavados três vezes com água destilada estéril. A secagem das placas ocorreu em temperatura ambiente. As células aderidas foram coradas com 200µl violeta de genciana a 0,25%. Após 5 minutos da aplicação do corante, os poços foram submetidos à lavagem e secagem, como descrito anteriormente, e foram adicionados 200µl de álcool: acetona na proporção 80:20. Em cada placa foi utilizado um poço contendo somente Caldo Triptona Soja como branco, uma cepa de *Escherichia coli* ATCC® DH 5α como controle negativo e os testes foram realizados em triplicata. A leitura da densidade óptica dos poços foi realizada por espectrofotometria a 620nm. Para classificar os isolados quanto à produção de biofilme, foi medida a densidade óptica média (DO) do controle negativo (DO_{CN}) e comparada com a DO média dos isolados (DO_{IS}), sendo estes classificados como: negativo (DO_{IS} < DO_{CN}); fraco (DO_{CN} < DO_{IS} < 2.DO_{CN}); moderado (2.DO_{CN} < DO_{IS} < 4.DO_{CN}); forte (4.DO_{CN} < DO_{IS}) formadores de biofilme.

Para avaliar a sensibilidade dos isolados frente aos sanitizantes, foram testados dois produtos, sendo eles: cloro na concentração de 5% e amônia quaternária a 10%. Ambos nas devidas diluições preconizadas pelo fornecedor. Os produtos têm seu uso autorizado pelo Ministério da Saúde para ambientes que manipulam alimentos.

A avaliação dos desinfetantes sobre os biofilmes de *L. monocytogenes* em formação e consolidados foi realizada conforme Peixoto et al. (2015), com alterações. Para os dois testes as colônias de *L. monocytogenes* formadoras de biofilmes foram inoculadas em tubos contendo 3mL de Caldo Triptona Soja (Himedia®) até turvação 0.5 de MacFarland e incubadas a 37°C por 24 horas. Para o biofilme em formação, adicionou-se 100µl da solução juntamente com 100µl do sanitizante, em placa de microdiluição de 96 poços, e seguiu-se a incubação a 37°C por 24 horas. Ao final desse período, o conteúdo de cada poço foi aspirado e foram realizadas três lavagens com água destilada estéril. A secagem da placa ocorreu em temperatura ambiente e as células aderidas foram coradas com 200µl violeta de genciana a 0,25% por 5 minutos. Novamente os poços foram lavados e submetidos à secagem. Em seguida, foram adicionados 200µl de álcool:acetona na proporção 80:20. Em cada placa foi utilizado um poço contendo somente Caldo Triptona Soja como branco, uma cepa de *Escherichia coli* ATCC® DH 5α como controle negativo e os testes foram realizados em triplicata. A leitura da densidade óptica (DO) dos poços foi realizada por espectrofotometria a 620nm. A determinação do grau de aderência, foi realizada conforme Merino et al., 2009, onde foram utilizadas as seguintes equações: ($DO_{IS} < DO_{CN}$) negativo; ($DO_{CN} < DO_{IS} < 2 \cdot DO_{CN}$) fraco; ($2 \cdot DO_{CN} < DO_{IS} < 4 \cdot DO_{CN}$) moderado; ($DO_{IS} > 4 \cdot DO_{CN}$) forte.

Para os biofilmes consolidados, adicionou-se 100µl da solução em placa de microdiluição de 96 poços e seguiu-se a incubação a 37°C por 24 horas. Em seguida, o conteúdo de cada poço foi aspirado e três lavagens com água destilada estéril foram realizadas. Após a secagem em temperatura ambiente, adicionou-se 200µl do sanitizante testado em cada poço e realizada de imediato uma leitura da densidade óptica a 620nm. A placa foi incubada a 37°C por 24 horas e, logo em seguida, foi realizada a segunda leitura da densidade óptica. A interpretação dos resultados foi realizada conforme Marino et al. (2010), onde a DO dos poços foi determinada imediatamente após a adição do sanitizante (0h) e 24 horas após incubação da

placa a 37°C, por espectrofotometria a 620nm, sendo a ação dos sanitizantes no biofilme consolidado definida pela equação: $100 - [(DO_{24h} \text{ média} / DO_{0h} \text{ média}) \times 100]$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as nove amostras coletadas em supermercados de grande porte na cidade do Recife, duas apresentaram resultado positivo para a contaminação por *L. monocytogenes*, identificando-se assim 22,22% (02/09) de amostras positivas (Tabela 1).

Identificou-se a presença de *L. monocytogenes* em oito amostras das 31 amostras adquiridas em supermercados de médio porte, também da cidade do Recife-PE, resultando em um percentual de 25,8% (8/31) de amostras positivas (Tabela 2).

A presença de amostras apresentando contaminação por *L. monocytogenes* é uma constatação importante, tendo em vista que os produtos são provenientes de supermercados pertencentes a redes que possuem programas de higienização e sanitizantes aprovados pelo Ministério da Saúde em suas instalações.

Estudo realizado por Fai et al. (2011) obteve um resultado superior ao apresentado nesse trabalho, pois isolaram *L. monocytogenes* em 17 das 40 amostras de presuntos fatiados, obtendo assim 42,50% de isolados, dos supermercados, de grande e médio porte da cidade de Fortaleza – CE.

Alguns pesquisadores apresentaram resultado inferiores, dentre eles Pettinati et al. (2006) que avaliaram a presença da bactéria em 14% amostras de salsichas provenientes de estabelecimentos varejistas da cidade de São Paulo - SP, pois obtiveram 56 isolados de *L. monocytogenes* dentre 394 amostras testadas.

Lapenda (2010), que isolou 21 cepas da bactéria em 47 amostras de presuntos e salsichas, identificou a presença de *L. monocytogenes* em 12,5% (06/47) e 6,25% (03/47) das amostras de presunto e em 10,42% (05/47) e 14,58% (07/47) das amostras de salsichas,

respectivamente em supermercados e em mercados públicos da cidade do Recife – PE. Cornelius et al. (2008) realizaram o isolamento de *L. monocytogenes* em dez amostras de presuntos fatiados dentre as 301 pesquisadas em supermercados nas cidades de Auckland, Wellington e Christchurch, na Nova Zelândia, representando 3,3% do total.

Os valores identificados, neste estudo, indicam à necessidade de uma maior atenção, dos órgãos ligados à saúde pública, para o estabelecimento de padrões para a presença do microrganismo em produtos cárneos, principalmente prontos para consumo. Tendo em vista que a *L. monocytogenes* apresenta uma dose infectante baixa, a contaminação é facilitada se não houver outra etapa pós-processamento para eliminá-la antes do consumo (OLIVEIRA et al., 2010).

O presunto sofre tratamento térmico suficiente para eliminar a *L. monocytogenes*, o que sugere que a contaminação, desse alimento, ocorra em etapas pós-processamento, estando relacionada a contaminações cruzadas durante a manipulação do produto. A etapa de fatiamento eleva o risco de contaminação, devido às condições de higiene durante a manipulação e ao contato com superfícies higienizadas de forma inadequada (FAI et al., 2011). Para eliminar a contaminação da *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo, são necessários treinamentos adequados para que os manipuladores se informem da necessidade de realizar o processo de higienização corretamente (PÉREZ-RODRIGUEZ et al., 2010).

Nesse contexto, é válido ressaltar a capacidade da *L. monocytogenes* formar biofilmes em superfícies que entram em contato com alimentos, os quais dificultam sua remoção através do processo de sanitização (KOCOT e OLSZEWSK, 2017). Essa condição sugere que o microrganismo pode estar presente em máquinas de fatiadoras de frios, mas também pode persistir em ambientes industriais.

Quando submetidas ao teste de formação de biofilmes *in vitro*, identificou-se duas cepas de *L. monocytogenes* capazes de formar biofilme, representando um valor total de 20% (02/10),

sendo uma (Isolado 1) proveniente de um supermercado de grande porte representando 50% (01/02) e a outra (Isolado 2) pertencente ao grupo dos supermercados de médio porte, correspondendo ao valor de 12,5% (01/08).

Identificou-se, nos biofilmes em formação, diferentes resultados para os produtos testados. Ambos os isolados, quando tratados com o cloro, apresentaram aderência moderada. Frente à amônia quaternária, houve uma melhor resposta, pois o isolado 1 se apresentou com fraca aderência e o isolado 2 não apresentou aderência. Nos biofilmes consolidados, o cloro apresentou diminuição na aderência nas amostras testadas, obtendo uma redução de 75,44% e 79,76% nos isolados 1 e 2, respectivamente. A ação da amônia quaternária frente representou uma diminuição de 64,84% no isolado 1 e 66,13% no isolado 2 (Tabela 3).

A presença de 20% dos isolados formadores de biofilmes se assemelha com resultados obtidos por Carandina (2013) que avaliou isolados de *L. monocytogenes* obtidos de amostras de ambientes de laticínios, queijos e salmouras, em Pirassununga – SP, e identificou que 16,2% (06/37) dos isolados foram capazes de formar biofilmes, nos ensaios em microplaca de polistireno. Já Bonsaglia (2012), que avaliou cepas de *L. monocytogenes*, isoladas de amostras de leite, vegetais e ambientes de processamento em Botucatu - SP apresentou um valor percentual inferior a esse estudo, pois obteve 6,2% (02/32) dos isolados capazes de aderir em placas de microdiluição. Nesse contexto, é importante considerar a presença de cepas formadoras de biofilmes em diferentes alimentos e ambientes, condição facilitada por se tratar de uma bactéria ubquitária. Além disso, *L. monocytogenes* possui a capacidade de suportar diversos estresses ambientais e persistir em ambientes de manipulação de alimentos (MEDRALA et al., 2003; SILVA et al., 2017).

As amostras isoladas foram classificadas como fortes formadoras de biofilmes. Essa capacidade de adesão pode ser influenciada pelas características da superfície aderente, pH, temperatura e das particularidades da bactéria (SILVA et al., 2017).

Ambos os sanitizantes foram capazes de reduzir a aderência nos biofilmes em formação e consolidados, no entanto o desinfetante a base de amônia quaternária apresentou um melhor desempenho, corroborando com o estudo realizado por Silva et al., 2017, o qual avaliou isolados de *L. monocytogenes* provenientes de amostras de superfícies de equipamentos de um Açougue e obteve redução da aderência, dos biofilmes em formação e consolidados, utilizando ambos os sanitizantes, porém a amônia quaternária foi mais eficiente que o cloro.

Os tratamentos realizados com o sanitizante à base de cloro apresentaram uma melhor eficiência para reduzir o biofilme consolidado, em ambos os isolados, em relação ao biofilme em formação. Folsom e Frank (2006), que identificaram uma maior resistência de *L. monocytogenes* ao cloro quando se apresenta em células planctônicas, em relação ao biofilme consolidado. Afirmam ainda que a resistência do biofilme constituído por *L. monocytogenes* a esse sanitizante tem relação com características genéticas, não identificando essa relação para as células livres. Outro fator relevante é o pH do produto, pois soluções de cloro abaixo da neutralidade tendem a mais eficientes contra as células de vida livre (BREMER et al. 2002). Entretanto a partir de informações da ficha técnica do sanitizante pode-se constatar que o mesmo apresenta um pH alcalino que varia entre 12,5 e 13,5.

A ação do quaternário de amônio foi bastante significativa nos biofilmes em formação, corroborando com a informação contida na ficha técnica do produto, a qual informa que o desinfetante é eficiente no controle da *L. monocytogenes* em sua forma livre. Além disso, o sanitizante conseguiu reduzir a aderência dos biofilmes consolidados, não havendo, no entanto, uma atuação satisfatória em relação ao biofilme em formação.

Uma vez que um biofilme está formado, sua remoção torna-se mais difícil (LI et al., 2018). Tratamentos com desinfetante mostraram pouco efeito em biofilme. Além disso, as bactérias associadas à matriz do biofilme podem diminuir a sensibilidade aos desinfetantes, em

comparação com as células planctônicas, ao longo do tempo, pois a matriz de exopolissacarídeos forma uma barreira que dificulta a penetração dos sanitizantes, impedindo a atuação dos mesmos nas camadas internas (BAN E KANG, 2016; OLSZEWSKA et al., 2016; LI et al., 2018).

Foi identificado que as células de *L. monocytogenes* podem apresentar resistência ao tratamento com o cloro e com amônia quaternária (LIU et al., 2017). A dispersão do microrganismo no ambiente é desencadeada por mudanças ambientais ou nutricionais no biofilme (WOOD et al., 2011). Assim essas formações são capazes de desenvolver características adaptativas à exposição recorrente a desinfetantes, tornando mais difícil o controle e a erradicação dos biofilmes (SILVA et al., 2017).

O isolamento de *L. monocytogenes* formadoras de biofilmes em alimentos é um aspecto de relevância na saúde pública, à medida que o biofilme permite uma maior disseminação da bactéria, a qual pode se distribuir no ambiente e iniciar ligações em outras superfícies facilitando assim a contaminação dos alimentos (OLSZEWSKA et al., 2016)

CONCLUSÕES

A presença de *L. monocytogenes*, principalmente das cepas com capacidade de formar biofilmes, em presuntos fatiados provenientes de redes de supermercados de médio e grande, é um fator relevante na saúde única, tendo em vista que se trata de um alimento pronto para consumo. É necessária uma fiscalização mais rigorosa, nos estabelecimentos, referente a utilização de sanitizantes adequados no processo de higienização, bem como a correta aplicação dos mesmos e a constante educação dos manipuladores de alimentos para possibilitar melhores condições de higiene e evitar a contaminação cruzada, visando combater a *L. monocytogenes* e prevenir a formação de biofilmes pelo microrganismo.

REFERÊNCIAS

BAN, G.; KANG, D. Effect of sanitizer combined with steam heating on the inactivation of foodborne pathogens in a biofilm on stainless steel. **Food Microbiology**, v.55, p.47-54, 2016.

BARROW. G.I.; FELTHAM. R.K.A. Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3 ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1993.

BELTRAME, C. A. et al. Adhesion of *Listeria monocytogenes* to cutting board surfaces and removal by different sanitizers. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v.10, n.1, p 41-47, 2015.

BREMER, P. J. et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* / *Flavobacterium* spp. biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, p.321–325, 2002.

BONSAGLIA, E. C. R. **Produção de biofilme por *Listeria monocytogenes* isoladas de diferentes alimentos**. 2012. 55 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

CARANDINA, D. C. F. **Avaliação dos biofilmes formados por isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de laticínios e perfil de resistência a agentes sanitizantes**. 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos) – Universidade de São Paulo

CORNELIUS, A. J.; HUDSON, J. A.; WONG, T. L. Enumeration and growth of naturally occurring *Listeria spp.* in unpackaged ham. **Food Microbiology**, v.25, p.407–412, 2008.

FAI, E. A. C. et al. *Salmonella sp.* and *Listeria monocytogenes* in fully cooked ham commercialized in supermarkets of Fortaleza (CE, BRASIL): risk factor for public health. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, n.2, p.657-662, 2011.

FOLSOM J. P.; FRANK, J. F. Chlorine Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms and Relationship to Subtype, Cell Density, and Planktonic Cell Chlorine Resistance. **Journal of Food Protection**, v.69, n.6, p.1292–1296, 2006.

IACUMIN, L. et al. Phage Inactivation of *Listeria monocytogenes* on San Daniele Dry-Cured Ham and Elimination of Biofilms from Equipment and Working Environments. **Microorganisms**, v.4, n.4, p.1-12, 2016.

ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004 Microbiological of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – part 1:detection method. AMENDMENT 1:Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. Geneve: ISO, 2004. 4 p.

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

LAPENDA, A. M. V. S. **Ocorrência de *Listeria* spp. em embutidos resfriados comercializados na cidade do Recife-PE.** 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

LEONG, D. et al. A 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, v.249, p.18–26, 2017.

LI, R. et al. Control of *Listeria monocytogenes* biofilm by paenibacterin, a natural antimicrobial lipopeptide. **Food Control**, v.84, p.529-535, 2018.

LIU et al. Effects of phenyllactic acid as sanitizing agent for inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v.78, p.72-78, 2017.

LUCHANSKY, J. B. et al. Survey for *Listeria monocytogenes* in and on Ready-to-Eat Foods from Retail Establishments in the United States (2010 through 2013): Assessing Potential Changes of Pathogen Prevalence and Levels in a Decade. **Journal of Food Protection**, v.80, n.6, p.903–921, 2017.

LUO, L. et al. A 12-month longitudinal study of *Listeria monocytogenes* contamination and persistence in pork retail markets in China. **Food Control**, v.76, p.66-73, 2017.

MARINO, A. et al. In vitro effect branch extracts of *Juniperus* species from Turkey on *Staphylococcus aureus* biofilm. **Immunology & Medical Microbiology**, v.59, p.470–476, 2010.

MEDRALA, D. et al. Persistence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from products in a Polish fish-processing plant over a 1-year period. **Food Microbiology**, v.20, p.715–724, 2003.

MERINO, N. et al. Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v.191, n.3, p.832–843, 2009.

PAGOTTO, F. et al. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples (MFHPB-30, 2001). In: Compendium of Analytical Methods, v.3. Disponível em: <<http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.> Acesso em: 13.mai. 2017.

PEIXOTO, M. M. R. et al. Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.2, p.105-109, 2015.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F. et al. Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. **Meat Science**, v.86, n.2, p.479-485, 2010.

Pettinati, N. N. et al. *Listeria monocytogenes* in hot dog suasages obtained from groceries stores in the city of São Paulo - A comparative and retrospective analysis of human listeriosis isolates. **Veterinária e Zootecnia**, v.13, n.2, p.182-191, 2006.

RODRIGUES, L. B. et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p1082-1085, 2010.

SILVA, D. A. L. et al. *Listeria* spp. contamination in a butcher shop environment and *Listeria monocytogenes* adhesion ability and sensitivity to food-contact surface sanitizers. **Journal of Food Safety**, v.37, n.2, p.1-8, 2017.

WANG, X. et al. Thermal inactivation kinetics of surface contaminating *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged agar surface and ready-to-eat sliced ham and sausage. **Food Research International**, v.89, p.843-849, 2016.

WOOD, T. K. et al. Engineering biofilm formation and dispersal. **Trends in Biotechnology**, v.29, p.87–94, 2011.

Tabela 1. Frequências absoluta e relativa dos resultados, para presença de *L. monocytogenes*, das amostras de presuntos adquiridas em supermercados de grande porte da cidade do Recife – PE.

Amostras	Frequência Absoluta (FA)	Frequência Relativa (FR)
Positivas	2	22,22%
Negativas	7	77,78%
Total	9	100%

Tabela 2. Frequências absoluta e relativa dos resultados, para presença de *L. monocytogenes*, das amostras de presuntos adquiridas em supermercados de médio porte da cidade do Recife – PE.

Amostras	Frequência Absoluta (FA)	Frequência Relativa (FR)
Positivas	08	25,8%
Negativas	23	74,2%
Total	31	100%

Tabela 3. Classificação dos isolados de *L. monocytogenes* quanto à capacidade de formar biofilmes e a interferência dos sanitizantes.

Capacidade de formar biofilme		Aderência do biofilme em formação		Redução da aderência do biofilme consolidado	
Isolado	Classificação	Cloro	Amônia	Cloro	Amônia
1	Forte	Moderada	Fraca	75,44%	64,84%
2	Forte	Moderada	Sem aderência	79,76%	66,13%

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de *L. monocytogenes*, principalmente das cepas com capacidade de formar biofilmes, em presuntos fatiados provenientes de redes de supermercados de médio e grande, é um fator relevante na saúde única, tendo em vista que se trata de um alimento pronto para consumo. É necessária uma fiscalização mais rigorosa, nos estabelecimentos, referente a utilização de sanitizantes adequados no processo de higienização, bem como a correta aplicação dos mesmos e a constante educação dos manipuladores de alimentos para possibilitar melhores condições de higiene e evitar a contaminação cruzada, visando controlar a *L. monocytogenes* e prevenir a formação de biofilmes pelo microrganismo.