

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

OCORRÊNCIA DE *LISTERIA* sp. E *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM
PRODUTOS DE PESCADO PRONTOS PARA CONSUMO: CORRELAÇÃO COM A
MICROBIOTA ACOMPANHANTE.

Mayara dos Santos Tavares

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**OCORRÊNCIA DE *LISTERIA* sp. E *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM
PRODUTOS DE PESCADO PRONTOS PARA CONSUMO: CORRELAÇÃO COM A
MICROBIOTA ACOMPANHANTE.**

Mayara dos Santos Tavares

Sob a Orientação da Professora

PhD Rosa Helena Luchese

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos

Seropédica, RJ

Dezembro 2022

T231o Tavares, Mayara dos Santos , 1997-
Ocorrência de Listeria sp. e Listeria
monocytogenes em Produtos de Pescado Prontos para
Consumo: Correlação com a Microbiota Acompanhante. /
Mayara dos Santos Tavares. - Niterói , 2022.
72 f.: il.

Orientadora: Rosa Helena Luchese.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, 2022.

1. Pescado pronto para consumo. 2. Listeria sp. e
Listeria monocytogenes. 3. Microbiota acompanhante.
I. Luchese, Rosa Helena , 1957-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos III.
Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



TERMO N° 1305/2022 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

N° do Protocolo: 23083.076973/2022-66

Seropédica-RJ, 20 de dezembro de 2022.

MAYARA DOS SANTOS TAVARES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 19/12/2022.

ROSA HELENA LUCHESE (Dra) UFRRJ (orientadora)

KAREN SIGNORI PEREIRA (Dra) UFRJ

GESILENE MENDONCA DE OLIVEIRA (Dra) UFRRJ

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 26/12/2022 16:55)
GESILENE MENDONCA DE OLIVEIRA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DTA (12.28.01.00.00.00.46)
Matrícula: 00033701

(Assinado digitalmente em 05/01/2023 15:55)
ROSA HELENA LUCHESE
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DTA (12.28.01.00.00.00.46)
Matrícula: 0009403

(Assinado digitalmente em 04/02/2023 11:12)
KAREN SIGNORI PEREIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 000.000.598-00

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **1305**, ano: **2022**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **20/12/2022** e o código de verificação: **110e8b12fb**

DEDICATÓRIA

Á minha amada mãe, Maria dos Santos,
amor que ilumina todos os meus dias, e ao
meu esposo Wilson Galdino meu
companheiro de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** meu amigo fiel por me manter bem espiritualmente e mentalmente durante todo momento.

Á minha orientadora Prof. PhD **Rosa Helena Luchese**, por me orientar, me passando conhecimentos, e proporcionando oportunidades de progredir na carreira acadêmica.

À toda a equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ por todo carinho e suporte durante todo o período de experimentos.

Um agradecimento especial aos técnicos **Edlene e Roberto**, e a auxiliar de laboratório **Dina**.

Ao Laboratório de Sanidade Avícola, pelas portas que foram abertas para que o trabalho pudesse ser realizado. Um agradecimento especial à Prof. PhD **Patrícia Gonzaga**, Prof. PhD **Huarrisson Azevedo** que auxiliou em todos os experimentos, e a doutoranda **Daniela dos Santos** por toda ajuda e cuidado.

Agradeço a todos os meus **amigos e colegas** que, de alguma forma, puderam me auxiliar em minha jornada acadêmica.

Agradeço à Coordenação do Curso de **Pós-Graduação de Ciência e Tecnologia de Alimentos** por toda a presteza ao longo desses 2 anos.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (**UFRRJ**) por fazer parte da minha vida.

Agradeço á **todos os professores** que passaram na minha vida acadêmica até aqui, cada um contribuiu de uma maneira especial para a minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”).

RESUMO

TAVARES, Mayara dos Santos. **Ocorrência de *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* em produtos de pescado prontos para consumo: Correlação com a microbiota acompanhante.** 2022. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

O consumo de pescado prontos para consumo no Brasil vem aumentando, principalmente devido ao alto valor nutricional e praticidade. Todavia um problema sanitário torna-se evidente, já que alimentos prontos não necessitam de um aquecimento antes do consumo, propiciando casos de listeriose, uma doença causada por *Listeria monocytogenes* bactéria capaz de crescer sob refrigeração. O objetivo desta pesquisa foi determinar a ocorrência de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* em produtos de pescado prontos para consumo com $\text{pH} \geq 5,0$ e $\text{Aa} \geq 0,94$, conforme estabelecido pelos padrões microbiológicos para alimentos, assim como correlacionar com a presença da microbiota acompanhante. Foram avaliadas 72 amostras de kani-kama, sendo 3 subunidades do mesmo lote analisados em 3 tempos diferentes e 48 amostras de salmão defumado e fatiado sendo 2 subunidades e dois tempos diferentes, coletados no município do Rio de Janeiro e região metropolitana. As amostras foram examinadas imediatamente após aquisição dos produtos congelados, considerado o dia (zero), e após 7 e 15 dias de armazenamento a 5°C para kani-kama, e por 30 dias para o salmão defumado e fatiado, simulando a possibilidade de armazenamento do produto sob refrigeração a 5°C em sua embalagem original. De 72 amostras de kani-kama, 23,6% e 45,8% testaram positivas para *Listeria* sp. pelos métodos de cultivo e PCR, respectivamente. Das amostras que apresentaram colônias verde azuladas presuntivas características de *Listeria* no ágar ALOA, 12,5% correspondiam a bactérias Gram positivas de gêneros interferentes. Com relação a presença de *L. monocytogenes* 4,2% das amostras de kani-kama foram confirmadas positivas por testes fenotípicos, e 29,2% por qPCR. A contagem mais alta de *Listeria* sp. em kani kama foi observada na marca kani 1 aos 7 dias de armazenamento a 5°C sendo média de $2 \pm 1,1$ Log UFC/g. Nenhuma amostra apresentou contaminação com *L. monocytogenes* acima do limite máximo de 2 Log UFC/g. De 48 amostras de salmão defumado e fatiado 33,3% e 56,2% testaram positivas para *Listeria* sp pelos métodos de cultivo e PCR, respectivamente. Para *L. monocytogenes* 10,4% foram confirmadas positivas por testes fenotípicos e 47,9% por qPCR. As contagens de *Listeria* sp. em salmão foram significativamente maiores após 30 dias de armazenamento ($P < 0,05$), e em duas das marcas comerciais avaliadas o número ultrapassou 2 Log UFC/g. Já para *L. monocytogenes* com confirmação por qPCR, nenhuma amostra ultrapassou a contagem de 2 Log UFC/g, estando de acordo com os padrões sanitários brasileiros. Como esperado detectou-se população maior de mesófilos aeróbios, psicrotróficos e bactérias lácticas no salmão defumado se comparado com kani-kama. Números mais altos de bactérias lácticas detectados nas amostras de salmão defumado e fatiado de cerca de 2 Log UFC/g foram muito baixos para exercerem algum tipo de interação com *L. monocytogenes*. Conclui-se que técnica de PCR mostrou maior sensibilidade para detecção de *Listeria* sp e *L. monocytogenes* se comparada com o método tradicional de cultivo. Embora nenhuma amostra de kani-kama ou de salmão defumado e fatiado tenha apresentado números de *L. monocytogenes* superior a 2 Log UFC/g, observou-se maior número de amostras positivas durante o armazenamento refrigerado comparadas ao tempo zero, indicando que a refrigeração por tempo longo pode representar um risco adicional a sanidade, mesmo para produtos ultra processados como o kani-kama.

Palavras-chave: pescado defumado, kani-kama, pronto para consumo, bactérias lácticas (BAL), *Listeria*.

ABSTRACT

TAVARES, Mayara dos Santos. **Occurrence of *Listeria* sp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat fish products: Correlation with the background microbiota.** 2022. 72 p. Dissertation (Master in Science and food technology). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

The consumption of ready-to-eat fish has grown significantly in recent years in Brazil, due to its high nutritional value and practicality for consumption. However, a health problem becomes evident, since ready-made products do not require heating before consumption, providing cases of listeriosis, a disease caused by *Listeria monocytogenes* bacteria capable of growing under refrigeration. . This research aimed to evaluate the incidence of *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* in ready-to-eat fish products with pH ≥ 5.0 and Aa ≥ 0.94 , as established by the microbiological standards for food, as well as to correlate with the presence of the background microbiota. Seventy-two samples of kani-kama were evaluated, with 3 subunits from the same lot analysed at 3 different times and 48 samples of smoked and sliced salmon, with 2 subunits and two different times, collected in the city of Rio de Janeiro and metropolitan region. The samples were examined immediately after purchasing the frozen products, which was considered the time zero, and after 7 and 15 days of storage at 5°C for kani-kama, and after 30 days for smoked and sliced salmon, simulating the possibility of storing the products under refrigeration in its original packaging. From the 72 kani-kama samples, 23.6% and 45.8% tested positive for *Listeria* sp. by the culture and PCR methods, respectively. Of the samples that showed presumptive turquoise colonies characteristic of *Listeria* on ALOA agar, 12.5% corresponded to Gram positive bacteria of interfering genera. Regarding the presence of *L. monocytogenes*, 4.2% of the kani-kama samples were confirmed positive by phenotypic tests, and 29.2% by qPCR. The highest count of *Listeria* sp. in kani kama was observed with the brand kani 1 after 7 days of storage at 5°C with an average of 2 ± 1.1 Log CFU/g. No sample showed contamination with *L. monocytogenes* above the maximum limit of 2 Log CFU/g. From 48 smoked and sliced salmon samples, 33.3% and 56.2% tested positive for *Listeria* sp by culture and PCR methods, respectively. For *L. monocytogenes* 10.4% were confirmed positive by phenotypic tests and 47.9% by qPCR. *Listeria* sp. in salmon were significantly higher after 30 days of storage ($P < 0.05$), and in two of the commercial brands, the number exceeded 2 Log CFU/g. Nevertheless, for *L. monocytogenes*, no sample exceeded the count of 2 Log CFU/g, which is in accordance with Brazilian health standards. As expected, a larger population of aerobic mesophiles, psychrotrophs and lactic acid bacteria was detected in smoked salmon compared to kani-kama. Although none of these populations exceeded 6 Log CFU/g, the salmon was already sensory compromised. Lactic acid bacteria population was higher in smoked salmon than in kani-kama, reaching *ca* 2 Log CFU/g, but yet too low to exert any kind of interaction with *L. monocytogenes*. It was concluded that the PCR technique showed greater sensitivity for the detection of *Listeria* sp and *L. monocytogenes* compared to the traditional culture method. Although no sample of kani-kama or smoked salmon showed numbers of *L. monocytogenes* greater than 2 Log CFU/g, a higher number of positive samples was observed during refrigerated storage compared to time zero, indicating that refrigeration for a long time can pose an additional health threat, even for ultra-processed food like kani-kama.

Keywords: smoked fish, kanikama, ready-to-eat, lactic acid bacteria (LAB), *Listeria*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismo de virulência e patogenicidade da infecção por listeriose em células humana.....7
- Figura 2.** Processo de obtenção do surimi.....11
- Figura 3.** Processo de obtenção do kani-kama a partir do surimi.....12
- Figura 4.** Fluxograma do processo para obtenção do salmão defumado e fatiado.....14
- Figura 5.** Esquema ilustrativo das etapas da análise qualitativa para detecção presuntiva de *Listeriamonocytogenes*.....18
- Figura 6.** Esquema ilustrativo das etapas desenvolvidas para enumeração de *Listeria monocytogenes*.....19
- Figura 7.** Esquema do procedimento utilizado para contagem de mesófilos aeróbios, psicrotróficos totais e psicrotróficos produtores e sulfeto de hidrogênio e bactérias lácticas.....20
- Figura 8.** Limite detecção de *Listeria* sp. A suspensão contendo 10⁶ UFC/mL corresponde a maior quantidade de gene alvo e a 10 UFC/mL o menor número de células detectável pelo gene alvo. O Poço L corresponde ao marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen®).....24
- Figura 9.** Gel de eletroforese de ensaio de PCR para a detecção do gene alvo da *Listeria* sp., utilizando oligonucleotídeos S2R e S2F. Fragmentos de DNA amplificados a partir da extração do kani-kama. Poços com C+ e C- são os controles positivos e negativos respectivamente, os outros poços com numerações correspondem as amostras de kani-kama que foram positivas e tem (890pb). E o Poço L corresponde ao marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen®).....25
- Figura 10.** Presença de *Listeria* sp. detectado por cultivo (A) e por PCR (B) em três diferentes marcas de kani-kama, analisados no dia da aquisição (tempo 0) e após 7 e 15 dias armazenado a 5°C.....26
- Figura 11.** Distribuição do Percentual de amostras de kani-kama positivas para *Listeria* sp. detectadas por PCR, entre as diferentes marcas comerciais (A) e durante os tempos amostrados (B), de (zero), 7 e 15 dias sob refrigeração a 5°C.....27
- Figura 12.** Placas de ágar ALOA com colônias que correspondem a bactérias Gram positivas de gêneros interferentes. As imagens (A e B) são colônias que cresceram nas amostras de kani-kama (C e D) no salmão defumado e fatiado.....28

Figura 13. Curva padrão para determinação do limite de detecção a partir de diluições decimais em série usando a cepa 02045 <i>L. monocytogenes</i> . O valor do ciclo de quantificação (Cq) obtido pela reação em cadeia da polimerase em tempo real usando a tecnologia SYBR com uma função do número inicial de cópias alvo.	29
Figura 14. Curva de dissociação do fragmento da <i>L. monocytogenes</i> amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) da cepa CLIST 02045.....	30
Figura 15. Placas de ágar ALOA das amostras de kani-kama confirmadas positivas para <i>Listeria monocytogenes</i> . Sendo (A) e (C) da marca kani 3 e (B) da marca kani 1.....	30
Figura 16. Coloração de Gram de <i>L. monocytogenes</i> cepa CLIST 02045 (A) e <i>L. monocytogenes</i> da amostra de kani-kama (B).....	31
Figura 17. Presença de <i>Listeria monocytogenes</i> detectado por qPCR em diferentes marcas de kani-kama no momento da aquisição (tempo zero) e ao longo do armazenamento refrigerado a 5°C por 7 e 15 dias.....	32
Figura 18. Médias e desvio padrão da contagem da <i>Listeria</i> sp. (A) e <i>Listeria monocytogenes</i> (B) em kani-kama no dia da aquisição (tempo 0) e após 7 e 15 dias armazenado a 5°C. As contagens foram feitas em ágar ALOA e a confirmação por PCR e qPCR. Para fins de cálculo, contagens < 1 Log de UFC/g, foram consideradas 1.....	33
Figura 19. Gel de eletroforese de ensaio de PCR para a detecção do gene alvo da <i>Listeria</i> sp., utilizando oligonucleotídeos S2R e S2F. Fragmentos DNA amplificados a partir da extração do salmão defumado e fatiado. Poços com C+ e C- são os controles positivos e negativos respectivamente, os outros poços com numerações corresponde amostras de salmão defumado e fatiado que foram positivas e tem (890pb). E o Poço L corresponde ao marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen®).....	34
Figura 20. Presença de <i>Listeria</i> sp. detectado por cultivo (A) e PCR (B) em diferentes marcas de salmão defumado e fatiado no momento da aquisição (tempo zero) e ao longo do armazenamento refrigerado a 5°C por 30 dias.....	35
Figura 21. Distribuição do Percentual de amostras de salmão defumado e fatiado positivas para <i>Listeria</i> sp. detectadas por PCR, entre as diferentes marcas comerciais (A) e durante os tempos amostrados (B) de (zero) e 30 dias sob refrigeração a 5°C.....	36
Figura 22. Curva de dissociação do fragmento de <i>L. monocytogenes</i> amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) da amostra de salmão defumado e fatiado.....	37
Figura 23. Placas de ágar ALOA das amostras de salmão defumado e fatiado confirmadas positivas para <i>Listeria monocytogenes</i> por testes fenotípicos, sendo (A e D) da marca SDe 1, (C e B) marca SDe 2 e (E) SDe 3.....	37
Figura 24. Presença de <i>Listeria monocytogenes</i> detectado por qPCR em diferentes marcas de salmão defumado e fatiado no momento da aquisição (tempo zero) e ao longo do armazenamento refrigerado a 5°C por 30 dias.....	38

Figura 25. Médias e desvio padrão da contagem da <i>Listeria</i> sp. (A) e <i>Listeria monocytogenes</i> (B) em salmão defumado e fatiado no dia da aquisição (tempo 0) e após 30 dias armazenado a 5°C. As contagens foram feitas em ágar ALOA e a confirmação por PCR e qPCR. Para fins de cálculo, contagens < 1 Log de UFC/g, foram consideradas 1.....	39
Figura 26. Média e desvio padrão da contagem de mesófilos aeróbios em kani-kama e salmão defumado e fatiado de três marcas comerciais, no momento da aquisição (tempo zero) e ao longo do armazenamento refrigerado a 5°C por 7 e 15 dias para kani-kama (A) e com 30 dias de armazenamento na temperatura descrita anteriormente (B).....	41
Figura 27. Média e desvio padrão da contagem de psicotróficos totais em kani-kama e salmão defumado e fatiado de três marcas comerciais, no momento da aquisição (tempo zero) e ao longo do armazenamento refrigerado a 5°C por 7 e 15 dias para kani-kama (A) e com 30 dias de armazenamento na temperatura descrita anteriormente (B).....	42
Figura 28. Imagem (A) placa com meio de cultura Lyngby sem inoculação (B) placa inoculada com salmão defumado com 30 dias sob refrigeração a 5°C, apresentando crescimento de microrganismos psicotróficos produtores de sulfito redutores, causadores do escurecimento do meio de cultura.....	43
Figura 29. Média e desvio padrão da contagem de bactérias lácticas em kani-kama e salmão defumado e fatiado de três marcas comerciais, no momento da aquisição (tempo zero) e ao longo do armazenamento refrigerado a 5°C por 7 e 15 dias para kani-kama (A) e com 30 dias de armazenamento na temperatura descrita anteriormente (B).....	45
Figura 30. Médias de pH do kani-kama e salmão defumado e fatiado de três marcas comerciais diferentes, no momento da aquisição (tempo zero) e ao longo do armazenamento refrigerado a 5°C por 7 e 15 dias para kani-kama (A) e com 30 dias para salmão defumado e fatiado (B).....	46

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

APC - Alimentos prontos para consumo

CLIST- Coleção de *Listeria*

BAL - Bactéria láctica

DNA: ácido desoxirribonucleico

FAO - Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)

µL: microlitro

°C: Celsius

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MRS - De Man, Rogosa and Sharpe (meio de cultura seletivo para lactobacilos)

pb: pares de base

PBS - Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato-salino)

PCA – Ágar Padrão para Contagem

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR: PCR em tempo real

TE: tampão eluição

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

WHO - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Testes mandatórios fenotípicos para detecção das espécies de <i>Listeria</i> sp.....	4
Tabela 2. Oligonucleotídeos de amplificação utilizados em PCR e qPCR.....	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Prevalência de <i>Listeria monocytogenes</i> em produtos de pescado prontos para consumo.....	4
3.2 Patogenicidade e Genes de Virulência da <i>Listeria monocytogenes</i>	6
3.3 Ecologia microbiana de produtos de pescado prontos para consumo.....	7
3.4 Regulamentação sanitária de alimentos prontos para o consumo.....	9
3.5 Pescado.....	10
3.5.1 Tecnologia de produção do kani-kama.....	10
3.5.2 Caracterização do salmão defumado e fatiado.....	12
3.6 Surtos de <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos prontos para consumo.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Desenho Experimental, Local e Período de Coleta das amostras.....	16
4.2 Amostragem.....	16
4.3 Descrição de ingredientes dos produtos de pesca pronto para consumo estudados e prazo de validade.....	17
4.4 Cepas de referência.....	17
4.5 Análises para Detecção e Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i>	17
4.5.1 Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	17
4.5.2 Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i>	18
4.6 Enumeração de mesófilos aeróbios.....	19
4.7 Enumeração de psicrotróficos totais e psicrotróficos produtores de sulfeto de hidrogênio.....	19
4.8 Enumeração de bactérias lácticas.....	19
4.9 Análise físico – química.....	20
4.9.1 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH).....	20
4.10 Procedimento para preparo de amostras para ensaio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	20
4.10.1 Detecção e identificação genotípica da <i>Listeria sp.</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	20
4.10.2 Protocolos de extração do DNA genômico.....	20
4.10.4 Amplificação dos genes.....	22
4.10.5 Análise da sensibilidade analítica da técnica.....	22

4.10.6 Análise estatística.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Detecção de <i>Listeria</i> sp. em kani-kama.....	24
5.2 Detecção de <i>L. monocytogenes</i> em kani-kama.....	28
5.3 Contagem de <i>Listeria</i> sp e <i>L. monocytogenes</i> em kani-kama.....	33
5.4 Detecção de <i>Listeria</i> sp. em salmão defumado e fatiado.....	34
5.5 Detecção de <i>L. monocytogenes</i> em salmão defumado e fatiado.....	36
5.6 Contagem de <i>Listeria</i> sp. e <i>Listeria monocytogenes</i> em salmão defumado e fatiado.....	39
5.7 Contagem de mesófilos aeróbios em kani-kama e salmão defumado e fatiado.....	40
5.8 Contagem dos psicrotróficos totais em kani kama e salmão defumado e fatiado.....	41
5.9 Contagem de bactérias lácticas em kani-kama e salmão defumado e fatiado.....	43
5.10 pH das amostras de kani-kama e salmão defumado e fatiado ao longo do tempo de armazenamento.....	45
6. CONCLUSÕES.....	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

Os critérios microbiológicos para os pescados frescos refrigerados prontos para consumo (APC) tem apresentado maior rigorosidade tanto a nível comercial nacional como internacional, com finalidade primordial de evitar contaminação com microrganismos patógenos (BUCHANAN; et al., 2017; ARCHER., 2018). *Listeria monocytogenes* é um importante patógeno psicrotrófico de origem alimentar, e o seu monitoramento tornou-se obrigatório em alimentos prontos para consumo, de acordo com os novos padrões microbiológicos para alimentos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu o limite de tolerância para *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo com pH $\geq 5,0$ e Aa $\geq 0,94$, é de 100 UFC/g ou mL (BRASIL, 2022).

Essa tendência de consumo está diretamente relacionada com a alta demanda do consumidor que está dando preferência por alimentos levemente processados, semielaborados e prontos para consumo, assim como de alto valor nutricional e que possam contribuir para a saudabilidade. A carne de peixe destaca-se como importante fonte de proteínas, contendo aminoácidos essenciais ao homem, além de ser rica em ácidos graxos poli-insaturados do grupo ômega-3 e possuir um baixo teor de colesterol. O consumo de alimentos prontos aumentou significativamente, principalmente os produtos de peixe curado e pré-prontos, devido a praticidade, já que esses produtos prontos para o consumo não necessitam de um aquecimento antes do consumo. Todavia, por questões de segurança microbiológica, é de extrema importância que a cadeia de frio seja respeitada, além disso outros métodos como a defumação e embalagem a vácuo ou com atmosfera modificada tem sido aplicados para aumentar a vida útil dos produtos. Porém, muitas dessas barreiras não têm efeito suficiente contra o crescimento e multiplicação de microrganismos patógenos com capacidade de crescimento em refrigeração, como também em ausência de oxigênio (HOEL; VADSTEIN; JAKOBSEN, 2019).

Esses cuidados aplicados são necessários para aumentar o tempo de prateleira de peixe prontos para consumo. Uma preocupação muito evidente com esses alimentos são os surtos envolvendo *L. monocytogenes*, pois é uma bactéria que tem a capacidade de se multiplicar em temperatura de refrigeração (MIYASAKI et al., 2009) e sobrevive em uma faixa de concentração de cloreto de sódio de 25% (JEYALETCHUMI et al., 2010). Como esses alimentos prontos não passam por um tratamento térmico adicional, todo cuidado é necessário para evitar que esse microrganismo consiga se desenvolver e causar Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), como a infecção denominada listeriose, que acomete principalmente gestantes, imunodeprimidos e idosos causando aborto em gestantes, meningite em indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida entre outras doenças (SOUZA et al., 2007).

A prevalência de *L. monocytogenes* em produtos de peixe prontos para consumo é influenciada pelas populações que compõem a microbiota acompanhante. Interações do tipo competitivo são esperadas quando a microbiota acompanhante é predominantemente de bactérias lácticas, que tem a capacidade de inibir o crescimento da *L. monocytogenes* sem alterar características sensoriais do produto (SARAOUI et al., 2016b), principalmente em alimentos defumados à frio ou semi-conservados (TAHIRI et al., 2009). As bactérias lácticas são muito mais utilizadas e exploradas em produtos lácticos, cárneos e vegetais se comparado com os pescados (ISEPPI et al., 2019a). Todavia, nos últimos anos muito se tem estudado sobre o papel dessas bactérias lácticas quando estão presentes nos pescados prontos para consumo. Algumas bactérias lácticas são mais estudadas em produtos de peixe prontos para consumo por terem algumas características peculiares, tais como a produção de bacteriocinas que são proteínas ou peptídeos bacterianos produzidos ao nível dos ribossomos e com atividade inibitória contra outras bactérias (LAHIRI et al., 2022) inibindo o crescimento de microrganismos deteriorantes e patógenos, como por exemplo a *L. monocytogenes* (BOULARES et al., 2012), como também

prolongam o tempo de prateleira do produto de pescado pronto para consumo por inibir deteriorantes (HWANHLEM et al., 2015). Os gêneros de bactérias lácticas mais estudados em pescado por terem a capacidade de produzir bacteriocinas e serem viáveis para aplicação de bioconservação são *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, e *Pediococcus* (CALO-MATA et al., 2008); BOULARES et al., 2017; ISEPPi et al., 2019).

Nos últimos anos tem se intensificado os relatos da ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo para os anos de 2016-2018, os produtos de pesca prontos para o consumo apresentaram o percentual de ocorrência de 4,7%, 5,3% e 2,7% respectivamente (ECDC, 2021).

Portanto, identificar a possível presença de *Listeria monocytogenes* em kani-kama e salmão defumado e fatiado congelados, é fundamental para conhecer as condições sanitárias destes produtos prontos para consumo comercializados no Brasil, assim como conhecer o tipo de interação que ocorre entre *L. monocytogenes* e as bactérias lácticas que possam estar presentes nesses alimentos.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo determinar a incidência de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* em produtos de pescado pronto para consumo de kani-kama e salmão defumado e fatiado e correlacionar com a presença de grupos microbianos da microbiota acompanhante.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* em produtos de pescado pronto para consumo de kani-kama e salmão defumado e fatiado no momento da aquisição dos produtos congelados e após armazenamento sob refrigeração.

2.2 Objetivos específicos

- Detectar *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* por cultivo e por PCR;
- Enumerar *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* em ágar Ottaviani e Agosti (ALOA) e confirmar por PCR;
- Enumerar mesófilos aeróbios totais;
- Enumerar os psicrotróficos totais e psicrotróficos produtores de sulfeto de hidrogênio;
- Enumerar as bactérias lácticas;
- Correlacionar a incidência de *Listeria* sp e *Listeria monocytogenes* com a ocorrência de microrganismos da microbiota acompanhante, especialmente bactérias lácticas;
- Avaliar mudanças no pH.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Prevalência de *Listeria monocytogenes* em produtos de pescado prontos para consumo

O gênero *Listeria* é constituído por bactérias Gram positivas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos, com morfologia de coco-bacilos ou bastonetes curtos com extremidades arredondadas apresentando 0,5 µm de diâmetro e 0,5 a 2.0 µm de comprimento. Apresenta capacidade de movimentar os flagelos peritríqueos, expressa na temperatura de 20 a 25°C, mas não a 37°C, catalase positiva, oxidase negativa, fermenta glicose e produz ácido láctico, não produz gás, e em presença do indicador vermelho de metila o cultivo fica amarelo indicando que o pH está acima de 4,5. É habitual encontrar *Listeria* em diferentes fontes naturais, tais como: rios, esgotos, silagens, fezes humana e animal, propiciando a transmissão para os seres humanos e animais (FARBER; PETERKIN, 1991).

Atualmente, com o avanço dos métodos moleculares foi possível detectar 20 espécies de *Listeria* entre elas, *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. grayi*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmanii*, *L. weihenstephensis*, *L. floridensis*, *L. aquática*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae*, *L. newyorkensis*, *L. costaricensis*, *L. thailandensis*, *L. goaensise* (ARSLAN; ÖZDEMIR, 2008; NÚÑEZ-MONTERO et al., 2018; EURL LM, 2021). Dentre todas essas, apenas duas são patógenas, *Listeria monocytogenes* que causa doenças em seres humanos e animais, o levando à problemas de saúde pública por causa da capacidade que a mesma tem de causar listeriose humana, uma infecção que acomete principalmente pessoas imunocomprometidas, gestantes, idosos e recém nascidos (BUCHANAN; ROBERT, et al., 2017), enquanto que os animais podem ingerir silagem contaminada com a bactéria patógena e desenvolver mastite, sendo os mais afetados os ovinos, caprinos e bovinos já os animais podem ingerir silagem contaminada com a bactéria patógena e desenvolver mastite, os mais afetados são os ovinos, caprinos e bovinos (JENSEN et al., 1996). *Listeria ivanovii* também é patógena, mas ataca somente os animais, principalmente os ruminantes causando enterite e abortos (BUCHRIESER et al., 2011).

Segundo a Norma ABNT NBR ISO 11920-2: 2020 os principais testes fenotípicos mandatórios para confirmação de 10 espécies da *Listeria* sp. podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Testes mandatórios fenotípicos para detecção das espécies de *Listeria* sp.

	Espécies					
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>
Aspecto microbiológico	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C
B-hemólise	+	+	-	-	(+)	-
L-ramnose	+	-	-	V	-	V
D-xilose	-	+	V	+	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	+
Gram	+	+	+	+	+	+

B e C Bacilos ou Cocosbacilos curtos V: reação variável (+): reação fraca +: mais de 90 % das reações positivas – : sem reação

Fonte: Adaptação da Norma ISO 11920-2: 2020

	Espécies			
	<i>L.</i>	<i>L.</i>	<i>L.</i>	<i>L.</i>
	<i>Feischmanii</i>	<i>marthii</i>	<i>rocourtiae</i>	<i>weihenstephanensis</i>
Aspecto microbiológico	B/C	B/C	B/C	B/C
B-hemólise	-	-	-	-
L-ramnose	+	-	+	+
D-xilose	+	-	+	+
Catalase	+	+	+	+

*Continuação

B e C Bacilos ou Cocos bacilos curtos V: reação variável (+): reação fraca +: mais de 90 % das reações positivas – : sem reação

Fonte: Adaptação da Norma ISO 11920-2: 2020.

Por ser um microrganismo patógeno de origem alimentar psicrotrófico (DEVER; SCHAFFNER; SLADE, 1993; DONELLY et al., 1992), esse microrganismo é considerado de difícil controle, uma vez que pode se desenvolver em uma ampla faixa de fatores intrínsecos e extrínsecos (LUNDÉN, 2004; BAKA et al., 2014), como: pH 4.4 a 9.6, atividade de água 0.92 a 0.97, tolerância de cloreto de sódio de até 25% a 4°C e temperatura entre -0,4 a 45°C (WAN NORHANA et al., 2010).

Para atender as novas demandas do consumidor, a indústria de alimentos tem voltado a sua atenção no desenvolvimento de novos produtos alimentares, especialmente os prontos para o consumo. É um grande desafio para a indústria de alimentos garantir a segurança microbiológica dos alimentos prontos para consumo pois não precisam passar por um processo de cocção ou qualquer outro processamento que elimine ou reduza os microrganismos que possam estar presentes nos alimentos após o processamento (FAO; WHO, 2019).

Os produtos prontos para consumo têm ganhado muito espaço nos últimos anos. O mercado Europeu tem identificado um crescimento muito significativo referente a esses tipos de alimentos, principalmente os processados de pescado, a ingestão está sendo muito intensiva, chegando a atingir quase todas as famílias, todavia é importante salientar que esses alimentos são consumidos sem serem expostos a um aquecimento (EFSA, 2018).

É necessário criar métodos para controlar a ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo, a fim de reduzir a carga microbiana desse patógeno de origem alimentar. Ainda que a listeriose humana apresente baixa prevalência, a mesma pode progredir para estágios de infecções mais graves e pode chegar a taxas com casos fatais que podem corresponder a 20-30% (LOMONACO; NUCERA; FILIPELLO, 2015). Nos últimos anos analisou-se na União Europeia uma crescente incidência de listeriose, sendo que, no ano de 2016 um total de 2536 casos de listeriose humana foram detectados, enquanto 19 estados-membros relataram 247 mortes devido a listeriose em 2016 (ECD; EFSA, 2017).

3.2 Patogenicidade e Genes de Virulência da *Listeria monocytogenes*

Em razão da multiplicação de *L. monocytogenes* ser intracelular, o controle da listeriose necessita de imunidade celular mediada. Assim, as pessoas que apresentam maior risco são pacientes imunocomprometidos, recém-nascidos e pessoas idosas (MATLE; MBATHA; MADOROBA, 2020)

O processo infeccioso engloba a expressão dos genes relacionados a patogenicidade, induzindo a infecção e promovendo a internalização própria através das células hospedeiras (CARVALHO; SOUSA; CABANES, 2014). Esta bactéria tem potencial de atravessar barreiras primordiais dos seres humanos, que são epitélio intestinal, barreira hematoencefálica, e a placenta, e conseqüentemente alastra-se para outros órgãos (CHEN et al., 2009).

A virulência encontrada nas diversas proteínas de superfície e secretadas por esse patógeno tem sido os principais meios de virulência (BIERNE et al., 2007). Assim, um processo infeccioso causado pela *L. monocytogenes* é desenvolvido atingindo a célula hospedeira que envolve várias etapas diferentes: adesão e invasão das células hospedeiras, internalização pelas células hospedeiras, quebra do vacúolo, proliferação intracelular e disseminação intercelular para a células vizinhas (VÁZQUEZ et al., 2001).

Ao ingerir o alimento contaminado com *L. monocytogenes* na chegada ao estômago, ocorre uma elevação na temperatura e a exposição ao baixo pH favorece a expressão de proteínas relacionadas ao estresse, dando início ao estágio de virulência desse patógeno (RAENGPRADUB; WIEDMANN; BOOR, 2008).

A adesão à superfície das células epiteliais ocorre através das interações das proteínas de superfície internalina A (InlA) e internalina B (InlB) com E-caderina e o receptor c-Met respectivamente. Na invasão da célula, a *L. monocytogenes* é presa por um vacúolo fagossômico, que tem potencial de destruir as bactérias patogênicas que foram englobadas, entretanto *L. monocytogenes* consegue sobreviver dentro dessas células por causa da sua patogenicidade apresentando resistência. Esse patógeno tem a capacidade de romper as membranas do vacúolo através da toxina produzida pela mesma, que é a listeriolisina LLO e fosfolipases específicas de fosfatidilinositol (plcA). Desta forma, estando livre no citoplasma da célula do hospedeiro a bactéria encontra características favoráveis para se multiplicar e por intermédio da Acta, proteína que tem função de polimerização e movimento intracitoplasmático, a *L. monocytogenes* é levada para o citoplasma das células vizinhas. Ao expandir para outras células através dos movimentos da Acta o patógeno aproveita para disseminar a infecção célula a célula, mediante a formação das membranas plasmáticas. Ao serem englobadas por células vizinhas, a *L. monocytogenes* fica associada em um vacúolo de membrana dupla que consegue desprender com a ajuda de LLO e plcB para começar um novo ciclo de vida, como pode ser visualizado no esquema abaixo (MATLE; MBATHA; MADOROBA, 2020; VÁZQUEZ et al., 2001).

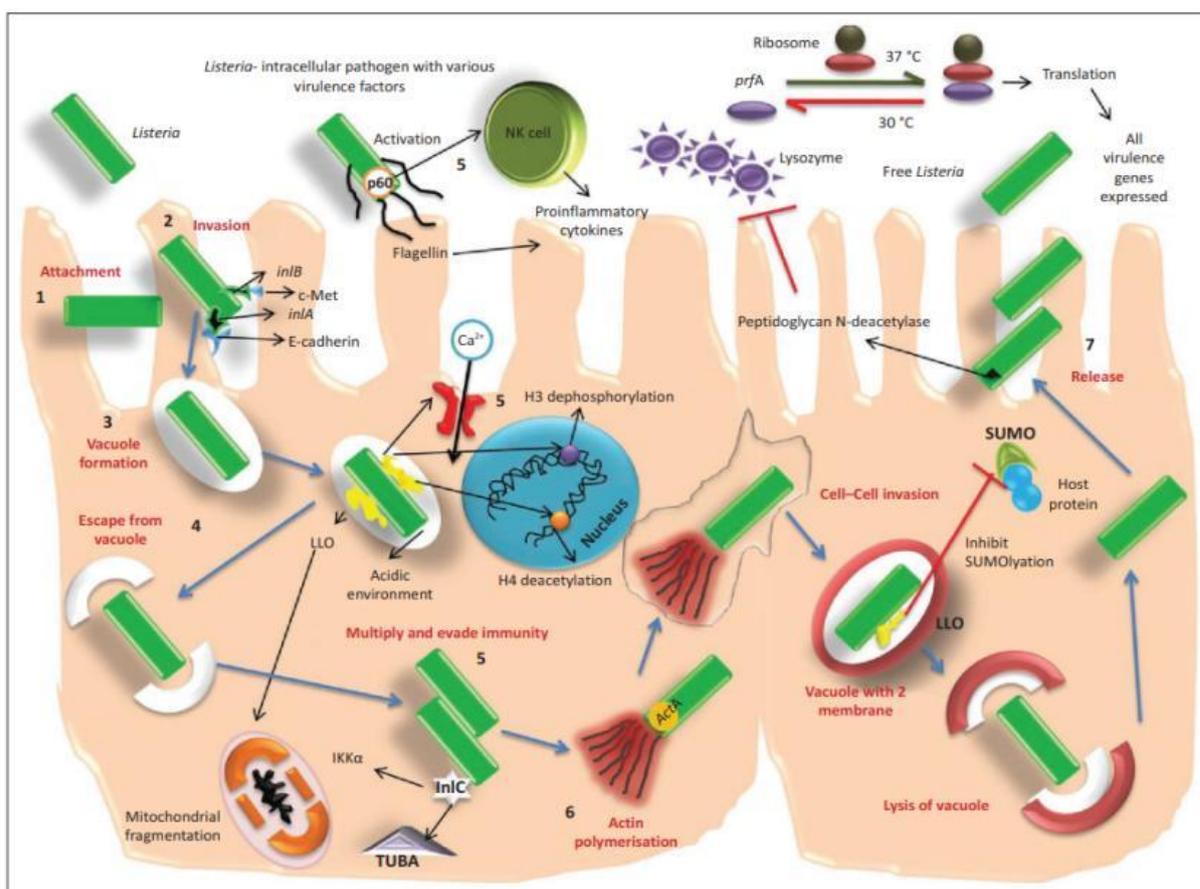


Figura 1. Mecanismos de virulência e patogenicidade da infecção por listeria em células humanas.
Fonte: Jadhav, S., 2015, Matle; Mbatha; Madoroba, 2020.

3.3 Ecologia microbiana de produtos de pescado prontos para consumo.

Os produtos de pescado prontos para consumo, como o kani-kama e salmão defumado e fatiado, podem propiciar o desenvolvimento de certos microrganismos, especialmente psicrotróficos, incluindo deteriorantes e patógenos, especialmente em alimentos levemente preservados (BUCHANAN;ROBERT et al., 2017).

L. monocytogenes é o principal microrganismo patógeno que pode estar presente e se multiplicar nesses alimentos, pois mesmo o armazenamento refrigerado e embalagem a vácuo não são barreiras para impedir o crescimento desse microrganismo e, conseqüentemente, representa um risco a saúde dos consumidores (BRILLET et al., 2004). Além disso, são comumente encontradas bactérias com capacidade de deteriorar o pescado mesmo defumado e embalado a vácuo, como membros da família Enterobacteriaceae, *Brochothrix thermosphacta*, *Vibrio* spp. e bactérias lácticas que tem potencial de produzir odores e características sensoriais desagradáveis no pescado durante o período de armazenamento (LEROI et al., 2001; STOHR et al., 2001; JOFFRAUD et al., 2006).

Para atender as demandas dos consumidores por alimentos mais saudáveis foi impulsionado um maior interesse em métodos naturais de conservação como a bioconservação (TOMÉ et al., 2008). Nesse sentido, espécies de bactérias lácticas dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, e *Pediococcus* tem sido recomendadas por terem a capacidade de produzir bacteriocinas e agir como bioprotetores em algumas matrizes alimentícias (CALO-MATA et al., 2008). Em semiconservas de pescados,

algumas espécie de bactérias lácticas tem sido mais estudadas, como os *Lactococcus lactis* (IBRAHIM; VESTERLUND, 2013; BOULARES et al., 2017), *Lactobacillus piscium* (SARAOUI et al., 2016b) *Carnobacterium maltaromaticum* (REIS et al., 2011; AYMERICH et al., 2019), *Carnobacterium divergens* (BRILLET et al., 2005) e *Enterococcus mundtii* (ISEPPI et al., 2019b), por terem a capacidade de produzir bacteriocinas e potencial de inibir a multiplicação de *L. monocytogenes*, como também de microrganismos deteriorantes que possam estar presentes no pescado embalado e preservado, sem alterar as qualidades sensoriais do produto.

O uso de microrganismos com potencial protetor ou de bioconservação ainda é incipiente quando a matriz alimentar é o pescado curado, sendo ainda um grande desafio para a indústria, se comparado com os laticínios e produtos cárneos. Por muito tempo acreditou-se que os processos iniciais de bioconservação ocorriam primordialmente em produtos fermentados e que seria pouco promissor em frutos do mar, por ser um produto de baixo teor de carboidratos (PILET; LEROI, 2011; SHARMA et al., 2022). Todavia, nos últimos anos foi identificado que algumas bactérias lácticas tem a capacidade de produzir ácido láctico, ácido acético e peróxido de hidrogênio (AYMERICH et al., 2000; BARBOSA; TEIXEIRA, 2022) e bacteriocinas (LEROI, 2009; DIOP et al., 2010 ; ISEPPI et al., 2019b) como também tem a capacidade de reduzir o pH para 5,0-4,5 melhorando a segurança do alimento, e consequentemente aumentando a vida de prateleira por evitar alterações indesejadas no produto devido a presença de microrganismos patógenos ou deteriorantes (ESSID; MEDINI; HASSOUNA, 2009).

Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas bacterianos produzidos ao nível dos ribossomos e com atividade inibitória contra outras bactérias (LAHIRI et al., 2022; REN et al., 2022). Algumas bactérias lácticas tem sido a melhor proteção biológica natural aplicada em pescados processados, principalmente contra *L. monocytogenes* (PILET; LEROI, 2011). A bioconservação é um método muito utilizado em alimentos com o propósito de estender a vida de prateleira do produto, utilizando microrganismos não patógenos isolados de alimentos que tenham a atividade antimicrobiana agindo contra o desenvolvimento de deteriorantes ou patógenos, como também ser utilizado como conservador biologicamente natural, que tem sido muito aplicado para pescado processado, como o salmão defumado e fatiado (STUPAR et al., 2021).

A pesar das bactérias lácticas terem apresentado muitos efeitos positivos, como descrito anteriormente, por outro lado podem apresentar várias desvantagens, como a produção de odores sulfurados e ácidos, associados a produção de H₂S, ácido acético (FRANÇOISE, 2010). *Lactobacillus sakei* geralmente produz ácidos orgânicos (STOHR et al., 2001) carnobactérias em nível elevado pode produzir características sensoriais rançosas, associados a produção de 2,3- butanodina levando a degradação do pescado (JOFFRAUD et al., 2001).

Um problema dos pescados frescos refrigerados prontos para consumo são as bactérias deteriorantes, incluindo bactérias aeróbias, como as do gênero *Pseudomonas*, porém podem ser controladas aplicando tecnologias de embalagem a vácuo ou com atmosfera modificada para aumentar a vida de prateleira do produto, inibindo o crescimento desses microrganismos. Por outro lado, microrganismos deteriorantes anaeróbios ou anaeróbios facultativos como *Shewanella putrefaciens* e bactérias da família *Enterobacteriaceae* não serão inibidos pela embalagem á vácuo e devem ser controlados por método alternativo, já que são capazes de crescer em anaerobiose e produzir sulfeto de hidrogênio (H₂S) e de reduzir o óxido de trimetilamina causando odores desagradáveis no pescado, quando em temperatura de refrigeração (STAMATIS ; ARKOUELOS, 2007; KOSTAKI, 2009).

O pescado apresenta alto teor de aminoácidos livres presente no tecido muscular, principalmente nas espécies pertencentes às famílias Scombridae, Scombresocidae, Clupeidae, Coryphaenidae (BRASIL, 1997) o que favorece o desenvolvimento de amins biogênicas,

através da descarboxilação pela ação de várias espécies de bactérias (LEE et al., 2015). Segundo Biji et al.(2016) algumas aminas biogênicas são recorrentes em pescados como a histamina, tiramina, triptamina, putrescina e cadaverina, estes são formados a partir de seus respectivos aminoácidos livres histidina, tirosina, triptofano, ornitina e lisina. Todavia, a histamina é a única amina biogênica com normas estabelecidas pelos órgãos fiscalizadores devido aos seus efeitos toxicológicos, como é o caso do envenenamento escombróide ou escombrototoxicose, que pode causar alguns sintomas ao consumidor, tais como, náuseas, vômito, coceira na pele e formigamento (KNOPE; SLOAN-GARDNER; STAFFORD, 2014) quando o pescado fresco estiver contaminado em níveis acima de 100 partes por milhão – 100 ppm de histamina (BRASIL, 1997). Algumas bactérias láticas com capacidade aminobiogênica, entre as quais cepas de *Enterococcus faecalis* e de *Streptococcus thermophilus*, tem sido reportada (TABANELLI et al., 2014) Por outro lado exopolissacarídeos produzidos por *L. paracasei* apresentaram capacidade de ligar-se e absorver histamina, sendo um candidato a detoxificação (KINOSHITA et al, 2021).

No Brasil o nível máximo para a presença no tecido muscular do pescado cru, assim como de produtos semielaborados desidratados, defumados ou não, empanados ou não, refrigerados ou congelados das espécies pertencentes às famílias Carangidae, Gempylidae, Istiophoridae, Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae, Scombrosidae, é 100 mg/Kg em amostra composta por 9 (nove) unidades amostrais e nenhuma unidade amostral com resultado superior a 200 mg/kg (BRASIL, 1997; BRASIL, 2022). Nos Estados Unidos a agência “Food and Drug Administration” (FDA) determinou que o pescado aceito para consumo tem que conter níveis de histamina inferiores a 50 mg/Kg para produto fresco e 100 mg/Kg para produto em conserva (FDA, 2011). Dessa forma, é evidente a preocupação dos órgãos competentes a respeito da presença dessa amina biogênica no pescado, visto que, podem causar efeitos toxicológicos graves que se manifestam por reações alérgicas, caracterizadas pela dificuldade de respirar, prurido, erupção, vômito, febre (SOUZA et al., 2016).

3.4 Regulamentação sanitária de alimentos prontos para o consumo

No Brasil a IN 161, de 06 de julho de 2022 (BRASIL, 2022) estabeleceu os procedimentos para o controle de *L. monocytogenes* em produtos prontos para o consumo, excetuando-se aqueles com vida útil menor que 5 dias, com pH menor ou igual a 4,4; atividade de água menor ou igual a 0,92, alimentos com combinação de $\text{pH} \leq 5,0$ e atividade de água $\leq 0,94$ e alimentos que tenham recebido tratamento térmico ou outro processo equivalente para eliminação de *L. monocytogenes* e que a recontaminação não seja possível. Sendo assim, a maior frequência de contaminação em alimentos prontos para consumo é em alimentos onde bactérias do gênero *Listeria* tornam-se mais competitivas como aqueles com vida útil prolongada, mas com $\text{pH} > 5,0$ e levemente preservados e $\text{Aa} \geq 0,94$, e armazenados sob refrigeração.

Podemos destacar ainda que os novos padrões microbiológicos nesses produtos prontos para consumo passaram a ser quantitativos, cujo limite estabelecido para a presença de *L. monocytogenes*, é de 100 UFC/g ou mL (BRASIL, 2022).

Outros países determinaram um nível de aceitabilidade para presença de *L. monocytogenes* em pescados prontos para consumo a mais de uma década, devido ao alto índice de doenças transmitidas por alimentos (DTA) causadas por esses produtos, como é o caso da União Europeia (EU). Segundo o Regulamento de Comissão Européia (EC, 2007) foi estabelecido o limite de 100 UFC/g do alimento dentro do prazo de validade, com a finalidade de evitar surtos de origem alimentar, mesmo limite estabelecido no Brasil.

3.5 Pescado

Os pescados contém alto teor de proteínas, cálcio, fósforo, lipídeos insaturado e baixo teor de colesterol quando comparados com outras fontes de proteínas de origem animal (MINOZZO, 2011). Entre os anos de 1960 a 2019 aumentou 3% anualmente, que corresponde ao dobro do crescimento anual da população brasileira mundial que foi de 1,6% (PRESENZA, 2019; FAO, 2022). Entretanto, trata-se de um alimento muito perecível, especialmente por conter alto teor de nitrogênio não proteico que é rapidamente degradado, tornando-se impróprio para o consumo humano, e causando perdas econômicas significativas, portanto um grande desafio para a indústria de alimentos (GUSTAVSSON; CEDERBERG; SONESSON, 2011). Visando minimizar estas perdas, a indústria de pescados inovou produzindo alimentos pré prontos ou prontos para consumo de frutos do mar, preservados de modo a não modificar sobremaneira as características de produto frescal, a fim de atender as demandas dos consumidores (FOGAÇA et al., 2015; SALES; SALES; OLIVEIRA, 2015).

Com essa necessidade de reduzir a rápida deterioração dos pescados, as indústrias pesqueiras estão aplicando novas tecnologias para aumentar a vida comercial desse tipo de alimento. Entre os métodos de conservação destacam-se as embalagens a vácuo e a atmosfera modificada que tem reduzido significativamente microrganismos que causam deterioração. Entretanto o armazenamento refrigerado gera condições adequadas sob as quais bactérias psicrotróficas podem se desenvolver. Foram identificadas novas espécies que podem estar envolvidas na deterioração, mas a principal comunidade encontrada em peixes de águas frias como salmão era composta de bactérias dos gêneros *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* e *Photobacterium* (CHAILLOU et al., 2014).

3.5.1 Tecnologia de produção do kani-kama

O kani-kama é um análogo de caranguejo desenvolvido a partir do surimi que é produzido da carne branca de peixe desossado, picada e lavada, na qual é processada na indústria de pescado para a fabricação de bastonetes (MARTIN-SANCHEZ et al., 2009). A aplicação dessa tecnologia de processamento do pescado é fundamental para a produção do kani-kama, essa inovação tem aumentado o tempo de prateleira e reduzido o desperdício de peixes (ALFARO et al., 2004; CAMPO-DEAÑO; TOVAR, 2009). O kani-kama é adicionado de condimentos, e principalmente implementado de aroma e sabor imitação de caranguejo. Diferente do surimi, o kani-kama torna-se um alimento menos propício para o desenvolvimento de microrganismos, devido a inserção de ingredientes e o tratamento adicional de temperatura, que tem impacto na redução significativa no crescimento de deteriorantes (BENNER; MCCARTHY; NYCKELSON, 2015). Porém é imprescindível que esses produtos sejam armazenados congelados (MEDINA; GARROTE, 2002).

Essa nova tecnologia de inovação agregou valor comercial ao Walleye Pollock (Escamudo-do-Alasca), devido suas características favoráveis para o desenvolvimento do surimi, sendo um pescado de carne branca de baixo valor comercial, devido a rápida ação das enzimas endógenas, mesmo recém capturado, e a partir dele produzir o kani-kama. Entretanto quando congelado com adição de sacarídeos o problema da acelerada degradação é reduzido significativamente (FUKUDA, 2014). Inicia-se a produção do kani-kama com a preparação da pasta de surimi a partir de pescados de carne branca, como pode ser visualizado na (Figura 2). O surimi consiste em um concentrado de proteínas miofibrilares obtido a partir do músculo do peixe triturado, lavado repetidamente com água, e adicionado de agentes crioprotetores para manter a estabilidade das proteínas durante o congelamento. A operação de lavagem da carne de pescado permite a eliminação de grande parte das substâncias que reduzem a estabilidade do surimi, especialmente proteínas sarcoplasmáticas que são hidrossolúveis, gordura, e compostos

azotados não proteicos. Como consequência é reduzido o sabor e odor de pescado (HOLLINGWORTH, 1994 apud MARTINHO, 2011; FOGAÇA et al., 2015b; SOMJID et al., 2021)

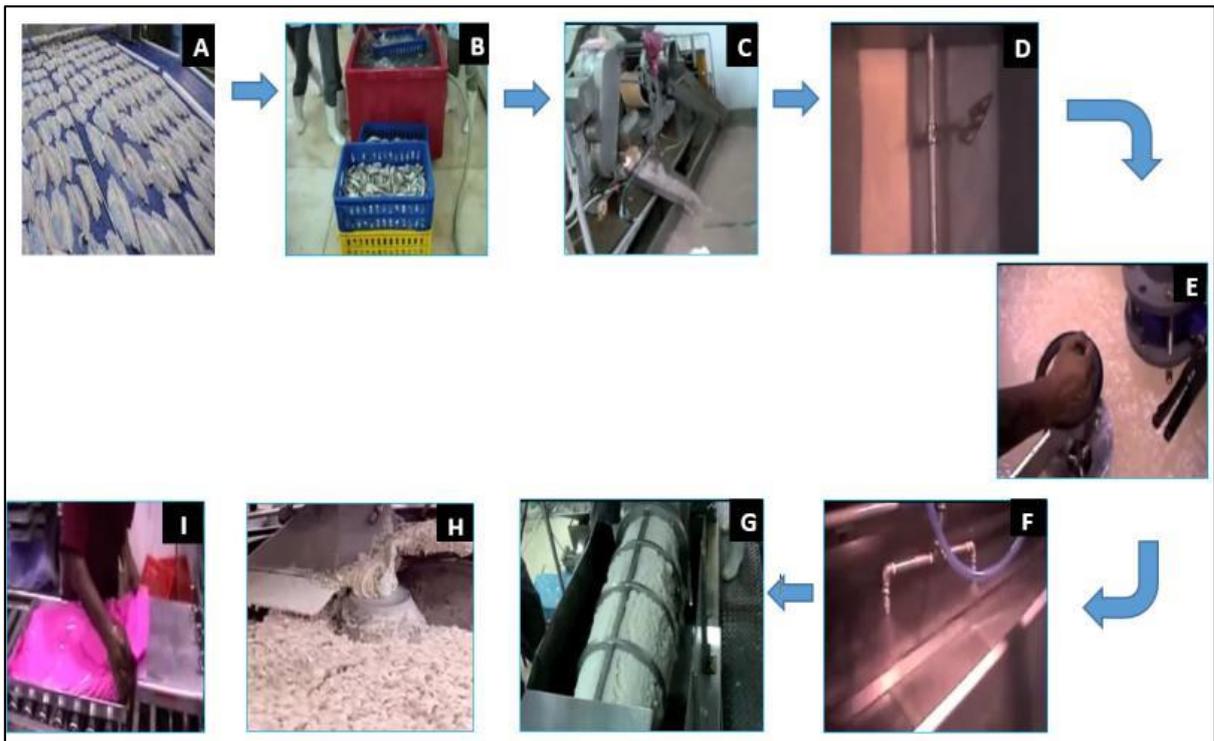


Figura 2. Processo de obtenção do surimi. Imagem A corresponde ao pescado de carne branca, B primeira lavagem com bicarbonato de sódio (0,4-0,5%) com água fria de 3 a 8°C para remoção das proteínas hidrossolúveis, C separação da carne mecanicamente separada e segunda lavagem com bicarbonato sódio (0,4-0,5%) com água fria de 3 a 8°C para remoção das proteínas hidrossolúveis, aumento do poder do gel e melhora da aparência, D terceira lavagem com bicarbonato sódio (0,4-0,5%) com água fria de 3 a 8°C para remoção das proteínas hidrossolúveis, aumento do poder do gel e melhora aparência, E quarta lavagem com bicarbonato sódio (0,4-0,5%) com água fria de 3 a 8°C para remoção das proteínas hidrossolúveis, aumento do poder do gel e melhora da aparência F lavagem com solução salina fraca para extração das proteínas solúveis, G Drenagem com centrifugação, H Homogeneização e adição de crioprotetores, blend de fosfatos e açúcares, I pasta de surimi embalado que é armazenado congelado.

Primeiramente a pasta formada é homogeneizada utilizando tanques de mistura, em seguida uma emulsão é desenvolvida com adição de conservantes, aditivos e aromatizantes, sendo que os ingredientes adicionados variam com a formulação de cada fabricante, como também a etapa que adiciona-se os corantes, devido a temperatura aplicada entre os processos que pode acarretar perdas na coloração do produto acabado, se o peixe for de águas frias quanto mais baixa a temperatura melhor, se for utilizado espécies de água quente pode ser entre 20 a 30°C. Com a pasta de surimi pronta a partir de pescados de carne branca, inicia-se a produção do kani-kama (Figura 3). Na máquina extrusora ocorre o cozimento em curto tempo por vaporização e forma-se lâminas de 1 mm de espessura e 18–20 cm de largura, em consoante são cortadas tiras com cortadores de 1 mm de espessura, a massa vai sendo transformada em bastões e cortado no tamanho adequado, por fim é realizado o empacotamento.

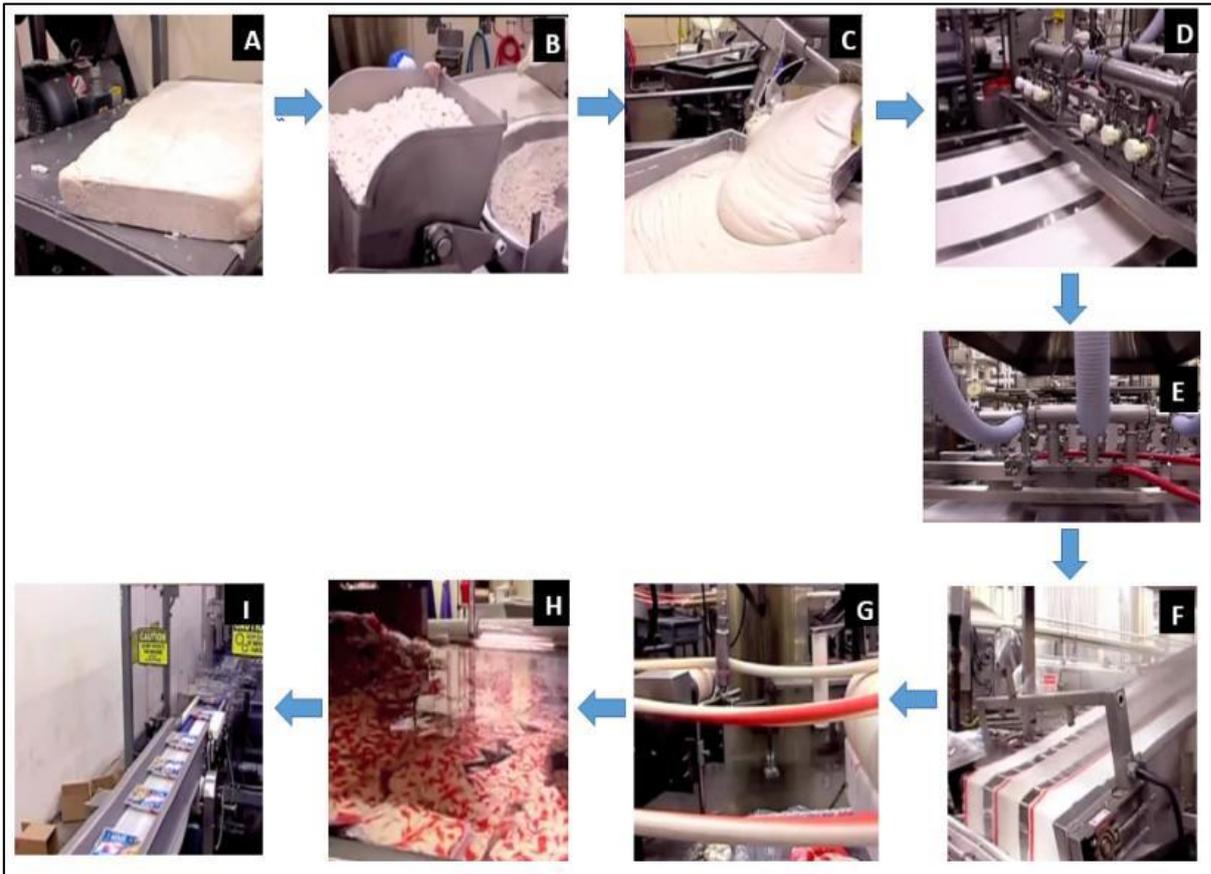


Figura 3. Processo de obtenção do kani-kama a partir do surimi. Imagem **A** pasta de surimi, **B** a pasta é picada, **C** junto a pasta de surimi é adicionado de 2 a 3% de água, amido, clara de ovo, óleo de girassol, sal, açúcar, glutamato, albuminas, **D** ocorre a extrusão das lâminas, gelatinização e cozimento no vapor aplicando entre 80 a 90°C por 20 a 40 minutos, **E** a máquina é programada para injetar corantes e aromatizantes nas lâminas extrusadas e cozidas **F** é a etapa em que as lâminas extrusadas já estão tingidas com corantes e aromatizantes, como o carmim, urucum e aroma imitação de carne de caranguejo, os corantes são adicionados depois do cozimento das lâminas para não danificar a cor do Kani Kama, **G** as lâminas são enroladas formando bastões e em seguida cortadas em tamanhos adequados **H** os bastonetes são embalados a vácuo, pasteurizado a 65°C por 30 min e posteriormente colocados em água fria **I** e por fim é armazenado congelado.

Fonte: (CULVER, C., 2008; FUKUDA, 2014; BOLÍVAR et al., 2021 com adaptação T. Ochi, comunicação pessoal, agosto, 2022.

3.5.2 Caracterização do salmão defumado e fatiado

A espécie salmão do atlântico (*Salmo salar*) é a mais consumida no Brasil por ser nativo da costa oeste do oceano atlântico norte (BEHS, 2011; GONÇALVES et al., 2019). Como no Brasil não há produção dessa espécie de pescado o acesso era difícil e o preço elevado, porém com o avanço da tecnologia pesqueira na produção em grande escala de salmão no Chile, esse pescado tornou-se mais acessível para o comércio e conseqüentemente para o consumidor (SILVA, 2011; CORDEIRO, 2017).

O salmão é um pescado muito apreciado, principalmente, na culinária japonesa (MORGANO et al., 2014). O salmão cru é muito utilizado para produção de alimentos prontos para consumo, como por exemplo o sashimi (ARAÚJO et al., 2020). O salmão fresco tem durabilidade de aproximadamente 20 dias, nesse tempo, todo cuidado na cadeia de frio é necessário, principalmente na distribuição para mercados distantes (SVEINSDOTTIR et al., 2002; SIVERTSVIK; ROSNES; KLEIBERG, 2003; MINOZZO, 2011). Todavia com a

implantação do processo de defumação, o salmão defumado torna-se levemente preservado e pronto para o consumo, e quando é comercializado em embalagem a vácuo tem durabilidade de 35 a 42 dias (EUMOFA, 2017).

O processo de defumação é aplicado em pescado com o intuito de melhorar as características sensoriais e aspectos do pescado. Além disso, as etapas de salga, secagem e defumação tem por finalidade um efeito conservador, devido ao aquecimento e a presença de compostos químicos da fumaça, como é o caso do fenol que tem a capacidade de inibir o desenvolvimento de microrganismos e o papel de antioxidante, consequentemente aumentando a vida útil do pescado, também pela redução da *Aa* (TODOROV et al., 2011; VALØ; JAKOBSEN; LERFALL, 2020).

Sendo assim, o salmão defumado é um alimento em conserva leve, que passa por um processo de salga, secagem e defumação, com a aplicação dessas etapas é possível conferir atributos sensoriais, modificar fatores intrínsecos do alimento, como a redução da atividade de água, umidade e consequentemente evitar a deterioração microbiana e aumentar a vida de prateleira do alimento (GIMENEZ; DALGAARD, 2004). É importante ressaltar que o pH do salmão defumado a frio é de 5.9 a 6.3 e a atividade de água é de 0.95 a 0.98 sendo favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos patogênicos, como *L. monocytogenes* (GIMENEZ; DALGAARD, 2004; CHEN et al., 2020).

Algumas etapas do processo para obtenção do salmão defumado e fatiado são críticas pois podem favorecer o desenvolvimento da *L. monocytogenes* como pode ser verificado na (Figura 4). Ao receber o salmão, a indústria retira as vísceras e realiza cortes que favoreçam o processo, em seguida inicia a fase de defumação. Na etapa da salga é primordial que seja executada com excelência para evitar falhas, geralmente a salga a seco dura de 10 a 40 h a depender da indústria e a temperatura de 0 a 4°C, a defumação a frio pode durar de 6 a 72 h a 15 a 28°C, é possível verificar que a temperatura aplicada nessa etapa não é suficiente para eliminar microrganismos que possam estar presentes no pescado e sejam patogênicos. O fatiamento e empacotamento a vácuo são duas etapas que necessitam de equipamentos para que esses procedimentos sejam realizados, representando dois pontos críticos para a segurança do produto, uma vez que não passará por uma pasteurização que realmente garanta a eliminação de microrganismos que possam estar presentes no pescado e sejam patogênicos (AALTO-ARANEDA et al., 2019).

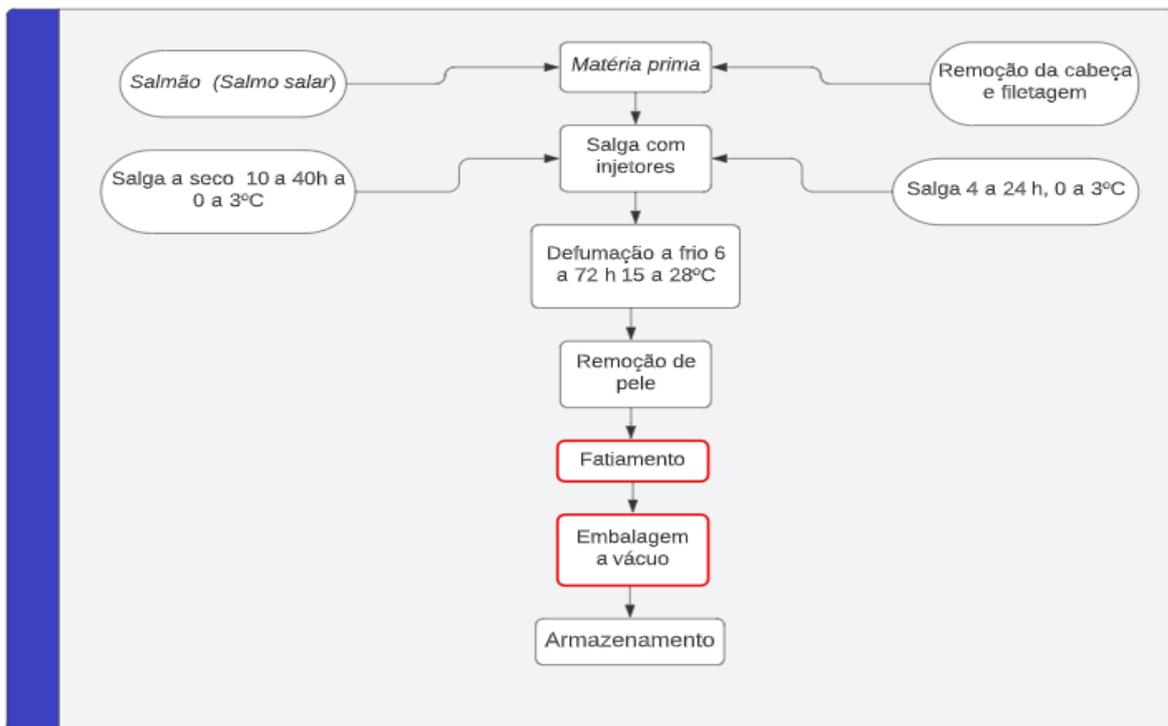


Figura 4. Fluxograma do processo para obtenção do salmão defumado e fatiado.

Fonte: Aalto – Araneda et al., 2019.

Sendo assim, a limpeza dos equipamentos utilizados nesses estágios finais deve ser rigorosa e realizados periodicamente, principalmente entre os processos para evitar que microrganismos oportunistas, como a *L. monocytogenes* consigam se multiplicar, uma vez que o salmão defumado, principalmente o a frio é consumido sem um aquecimento prévio antes de ser ingerido. Implantar um manual de limpeza e desinfecção eficiente e aplica-lo com a frequência necessária, é imprescindível para evitar contaminações microbianas nesses alimentos prontos para consumo (AALTO-ARANEDA et al., 2019; SPANU; JORDAN, 2020).

Diferente do kani-kama, que passa por um processo de pasteurização após os bastões serem embalados a vácuo, o salmão defumado e fatiado, logo após a estágio de fatiamento etapa que pode está propicia a contaminação com a *Listeria monocytogenes* é seguido do empacotamento a vácuo, não passando por processo de pasteurização e, aparentemente, poderia apresentar um risco maior de contaminação. Mas, o produto é congelado pelo método rápido e mantido a temperatura de estocagem de -18°C.

3.6 Surto de *Listeria monocytogenes* em alimentos prontos para consumo

O consumo de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* ocasiona a listeriose, com manifestações clínicas que podem resultar em meningite, septicemia, aborto espontâneo, infecções neonatais e gastroenterite. Esta doença de origem alimentar, apesar da baixa incidência, é considerada grave por apresentar altas taxas de mortalidade, especialmente em idosos, crianças, indivíduos imunocomprometidos e mulheres grávidas (ILSI, 2005; FDA, 2012 CDC, 2021).

Segundo o relatório do Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC), no período de 2015 a 2019, foram reportados por 28 países membros (PM) da união europeia (UE) 12.324 casos invasivos de listeriose em humanos, com taxas variando de 0,43 a 0,48 casos por 100.000 habitantes. Informações sobre hospitalizações foram fornecidas em 51,1% dos casos confirmados, por 19 países membros. Entre os casos em que a informação sobre a

hospitalização foi relatada, 92,1% resultaram em internação. Estes dados posicionam a listeriose como a zoonose de maior proporção de casos de hospitalização da UE (ECDC, 2021).

O relatório ressalta ainda que houve um aumento constante no número de mortes entre 2010 e 2019, com média de 217 mortes por ano. A taxa de mortalidade entre os casos com desfecho conhecido aumentou em 2019 (17,6%), quando comparados a 2018 (13,6%) e 2017 (15,6%), números considerados altos, e que posicionam a listeriose como uma das mais graves doenças de origem alimentar sob vigilância UE. Em relação a faixa etária, a doença apresentou maior incidência na população acima dos 64 anos, passando de 56,1% em 2008 para 64,5% em 2019. Em indivíduos acima de 84 anos esse aumento foi mais acentuado, passando de 7,3% para 14,3% no mesmo período. A taxa de letalidade também foi maior na faixa etária dos 64-84 anos (19,5%) e acima dos 84 anos (23,0%) em 2019 (ECDC, 2021).

Em relação a ocorrência de *L. monocytogenes* por categoria de alimentos prontos para consumo (APC), o relatório apresentou os seguintes valores para número de amostras testadas e percentual de amostras positivas em 2019: queijos duros elaborados com leite pasteurizado, 5647 (0,04%); produtos de padaria, 6653 (0,2%); molhos e temperos, 369 (0,3%); queijos moles e semi-moles elaborados com leite pasteurizado, 3537 (0,3%); especiarias e ervas, 291 (0,7%); queijos moles e semi-moles elaborados com leite cru, 1224 (0,9%); queijos duros elaborados com leite cru, 1849 (1,0%); APC de carne de frango, 4872 (0,9%); APC de carne de peru, 128 (1,6%); APC de frutas e vegetais, 2357 (1,7%); APC de carne suína, 28837 (2,1%); APC de carne bovina, 2038 (2,8%); saladas prontas, 3138 (3,5%); APC de produtos de pesca, 7725 (4,3%). Para os anos de 2016-2018, os produtos de pesca prontos para o consumo apresentaram o percentual de ocorrência de 4,7%, 5,3% e 2,7% respectivamente (ECDC, 2021).

A severidade da doença associada ao consumo de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* e a capacidade do microrganismo de se desenvolver em condições adversas, bem como a alta incidência em APC, apontam para a necessidade de adoção de medidas de controle em toda a cadeia produtiva de alimentos, em especial para aqueles que não requerem tratamentos adicionais antes do consumo (CRUZ et al., 2008).

Entre as medidas de controle passíveis de serem aplicadas pela indústria para minimizar os riscos de *L. monocytogenes* em produtos de pesca, cita-se a necessidade de um rigoroso controle de fornecedores, o que em última análise, forçaria uma melhora sanitária em toda a cadeia produtiva. Ademais, a rigorosa adoção das boas práticas de fabricação, APPCC, controle da qualidade do produto final e outras formas de impedir/minimizar a ocorrência de *Listeria* nos produtos tem um impacto direto na contenção da patologia associada ao microrganismo (CDC, 2021; FDA, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho Experimental, Local e Período de Coleta das amostras

Trata-se de um estudo descritivo transversal, realizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro nos Laboratórios de microbiologia de alimentos no Departamento de Tecnologia de Alimentos e Laboratório de sanidade avícola no instituto de veterinária na UFRRJ. A coleta das amostras foi realizada entre os meses de outubro 2021 a julho/2022. A identificação dos locais, onde foram adquiridas as amostras, como também os fabricantes dos produtos foram codificados e mantidos em sigilo respeitando os conceitos éticos.

As amostras do kani-kama foram adquiridas nos supermercados de diferentes regiões do Rio de Janeiro (região metropolitana, baixada fluminense e região norte fluminense), e as amostras do salmão defumado e fatiado foram compradas na zona sul do Rio de Janeiro e zona sul do município de Niterói, únicos lugares que vendiam o alimento, sendo três marcas disponíveis para a comercialização de ambos os produtos, como também de lotes diferentes. Foram analisados produtos levemente preservados de forma industrializada e embalado a vácuo, as amostras foram constituídas de dois tipos de produtos de pescado prontos para consumo diferentes, tais como: kani-kama, e salmão defumado e fatiado.

Para detecção e contagem de *L. monocytogenes*, bactérias láticas, mesófilos e psicrotróficos, para kani-kama foram utilizadas três unidades amostrais de cada produto sendo do mesmo lote, a primeira amostra foi analisada no dia da aquisição que foi considerado o dia 0 para ambos os produtos, a segunda após 7 dias e a terceira com 15 dias de estocagem, simulando a possibilidade de o consumidor armazenar o produto sob refrigeração em sua embalagem original. Já para salmão defumado e fatiado a segunda avaliação foi realizada após 30 dias de estocagem refrigerada.

Foi utilizado três marcas de kani-kama (kani 1, kani 2 e kani 3), três marcas de salmão defumado e fatiado (SDe1, SDe2 e SDe3). As codificações das amostras são as iniciais dos próprios produtos que serão analisados. As marcas podem ser coincidentes, como por exemplo, alguma marca de kani-kama pode ser a mesma do salmão defumado e fatiado. As amostras de kani-kama e salmão defumado e fatiado embaladas a vácuo tem validade comercial de 2 anos quando mantidas congeladas a -18°C.

4.2 Amostragem

Foram analisadas um total de cento e vinte (120) amostras divididas entre dois produtos selecionados de marcas e/ou lotes diferentes para o estudo, consistindo de 72 amostras de kani-kama, sendo que foram 3 subunidades do mesmo lote analisados em 3 tempos diferentes e 48 amostras de salmão defumado e fatiado sendo 2 subunidades e dois tempos diferentes. As amostras foram coletadas entre os meses de outubro de 2021 a julho de 2022 e acondicionadas em caixas térmicas com gel reciclável para manter a temperatura ideal para evitar alterações indesejáveis e transportadas para o laboratório de microbiologia de alimentos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sendo a primeira subamostra analisada de imediato (dia 0), e as restantes mantidas sob refrigeração a 5°C e analisadas nos tempos indicados. Após realizar as análises microbiológicas, 2 g de cada amostra foram armazenadas sob congelamento a -20°C no laboratório de Sanidade Avícola para posterior extração de DNA e análise por PCR, qPCR e sequenciamento de 10 amostras que foram positivas para *Listeria* sp.

4.3 Descrição de ingredientes dos produtos de pesca pronto para consumo estudados e prazo de validade

Nas descrições das embalagens dos kani-kama analisados tinham os seguintes ingredientes em comum entre as marcas analisadas: surimi (carne de pescado), amido, proteína de soja, sal, açúcar, clara de ovos, aroma natural de caranguejo, estabilizantes sorbital (INS 420), tripolifosfato de sódio (INS 451i) corante carmim (INS 120) e urucum (INS160b). A validade comercial quando conservado no freezer a -18°C tem 2 anos que é o tempo máximo em todas as amostras estudadas, quando armazenado no congelador de geladeira -12°C a validade comercial é 5 dias. Já o salmão defumado é composto de sal, açúcar e conservante sorbato de potássio (INS 202) e tem validade comercial diferente a depender do tipo de armazenamento, em conservação doméstica com a embalagem fechada dentro do prazo de validade comercial de consumir em até 4 meses em congelador a -4°C ou mais frio, quando armazenado no freezer a -18°C ou mais frio com o prazo de 2 anos. É importante ressaltar, que em ambos os produtos analisados nas embalagens descrevem que após a embalagem aberta, consumir em até 24 horas, e uma vez descongelado, não recongelar.

4.4 Cepas de referência

Listeria monocytogenes CLIST 02034 e CLIST 02045, *Listeria Innocua* CLIST 02050, *Listeria Ivanovii* CLIST 02057, *Listeria Seeligeri* CLIST 02067 foram selecionadas como cepas de referência para controle positivo durante o desenvolvimento e avaliação dos experimentos durante a identificação bioquímica e pelo método de cPCR e qPCR. Estas cepas foram obtidas da coleção de *Listeria* (CLIST) do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LABZOO) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As mesmas foram reativadas em meio TSYEA ágar – extrato de levedura de soja triptona, incubadas a 37°C por 24 h e em seguida visualizada em microscópio.

4.5 Análises para Detecção e Enumeração de *Listeria monocytogenes*

Foram realizadas as análises qualitativas e quantitativas de *L. monocytogenes* em pescados prontos para consumo, com intuito de verificar se está de acordo com a legislação estabelecida para os padrões microbiológicos para produtos prontos para consumo vigente no Brasil. E correlacionar com a possível interação de bactérias lácticas na microbiota acompanhante.

Todas as embalagens dos produtos foram abertas assepticamente para as análises microbiológicas.

4.5.1 Detecção de *Listeria monocytogenes*

Para detectar a presença de *L. monocytogenes* nas amostras de alimentos seguiu-se o procedimento estabelecido na norma ABNT NBR ISO 11290-1:2020).

Inicialmente foi realizado a etapa de enriquecimento pesando-se 25 gramas da amostra para 225 ml do caldo de enriquecimento primário, o demi- Fraser (Himedia, Mumbai, Índia), seguida de incubação a 30°C, por 24 horas. Posteriormente, 0,1 ml do caldo foi transferido para um tubo, contendo 10 ml do meio de enriquecimento secundário, o caldo Fraser broth base (Himedia, Mumbai, Índia) com incubação a 37°C por 24 horas.

Em consequente, o tempo de incubação do caldo de enriquecimento secundário, foi realizado uma agitação dos tubos, e com o uso de uma alça de inoculação estéril foi realizado o estriamento na superfície de placas de ágar *Listeria* segundo Ottaviani e Agosti ALOA

(Himedia, Mumbai, India) como também de um meio adicional, ágar Palcam (Oxoid, Basingstoke, UK) de modo a obter colônias isoladas. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Os resultados foram expressos como: Presença ou Ausência de *L. monocytogenes* em 25 g ou mL A (Figura 5) ilustra o procedimento usado para detecção presuntiva de *L. monocytogenes*.

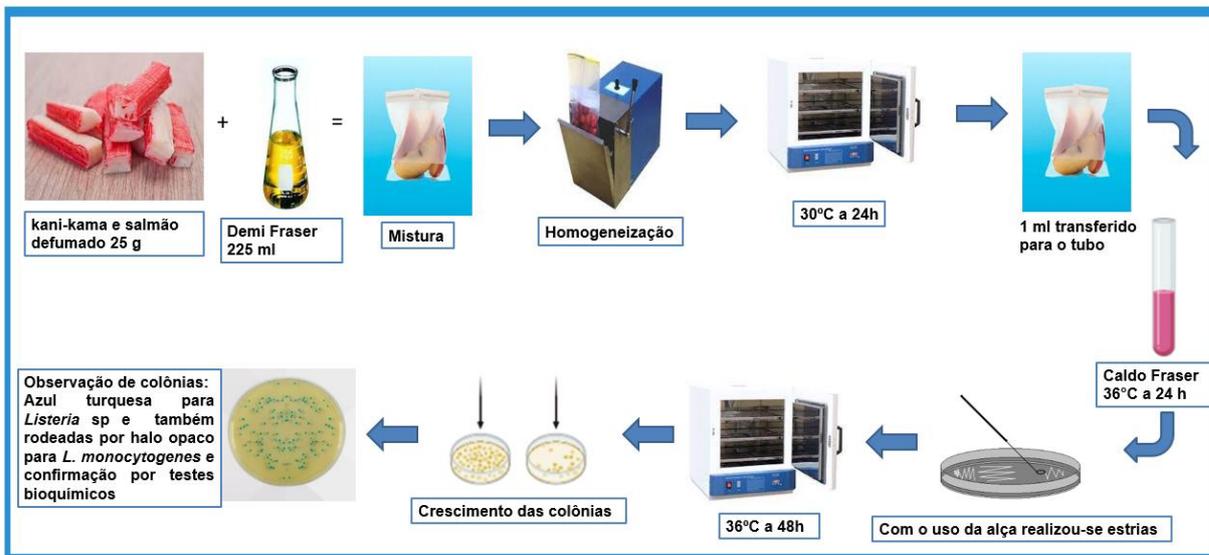


Figura 5. Esquema ilustrativo das etapas da análise qualitativa para detecção de *Listeria monocytogenes*.

Logo após a incubação foram realizados testes mandatórios de confirmação para *L. monocytogenes*, como o aspecto microscópico, beta hemólise, e de fermentação dos açúcares, L-ramnose e o D-xilose e catalase como teste complemento.

4.5.2 Enumeração de *Listeria monocytogenes*

A enumeração de *L. monocytogenes* foi realizada segundo a Norma ABNT NBR ISO 11920-2: 2020. Foram pesadas 25 gramas de cada amostra, homogeneizadas com 225 mL da solução de água peptonada tamponada, obtendo-se a diluição 10^{-1} . A seguir, 1,0 ml desta diluição inicial foi distribuída em volumes de 0,3, 0,3, 0,2 e 0,1, 0,1 em cinco placas de Petri contendo ágar ALOA e espalhados na superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas por 24 horas, a temperatura de 37°C, em consequente foi realizado a enumeração após a primeira incubação para realizar uma melhor contagem, caso tivesse ocorrido crescimento, e foi considerado *L. monocytogenes* as colônias que tivessem características azul-esverdeadas circundadas e com o halo opaco. Para a confirmação de colônias presuntivas de *L. monocytogenes*, tomou-se de cada placa de Petri, representando cada diluição, cinco colônias no total, representativas para cada tipo de colônia, por exemplo, com grande halo e pequeno halo, realizando os testes bioquímicos indicados. Um esquema ilustrativo das etapas desenvolvidas para enumeração da *L. monocytogenes* pode ser observado na (Figura 6).

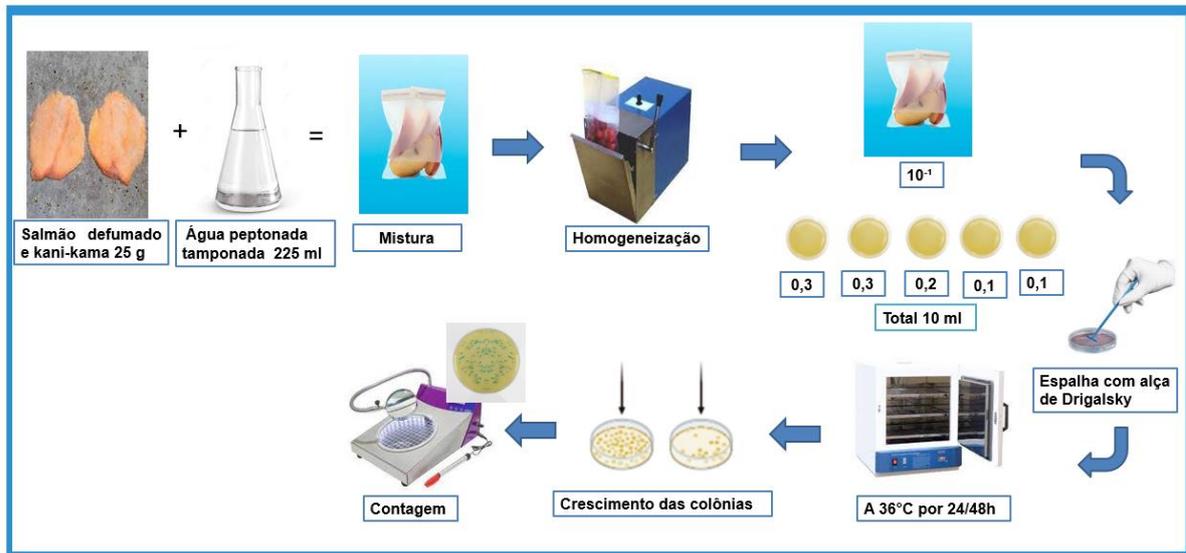


Figura 6. Esquema ilustrativo das etapas desenvolvidas para enumeração de *Listeria monocytogenes*.

4.6 Enumeração de mesófilos aeróbios

Para realizar a contagem de mesófilos aeróbios foi seguido a metodologia ABNT NBR ISO 4833-2 (2015).

Foram pesados em sacos de stomacher estéreis 25 gramas da amostra que foi homogeneizada em homogeneizador stomacher (Stomacher® 400 lab blender, Seward) com 225 ml do diluente (água peptonada a 0,1%) obtendo-se a diluição 1:10. Foram preparadas diluições decimais seriadas sucessivas, transferindo-se 1,0 mL da suspensão inicial para tubos com 9 mL do diluente. A seguir alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em superfície de placas de Petri em duplicata contendo ágar contagem PCA (Merck, Darmstadt, Germany). Após 15 minutos, tempo necessário para o inóculo ser absorvido pelo ágar, as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 30°C por 72h.

Para a contagem foram selecionadas as placas com menos de 300 colônias e com o auxílio de um contador de colônias (Biocell). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por gramas (UFC/g).

4.7 Enumeração de psicrotróficos totais e psicrotróficos produtores de sulfeto de hidrogênio

Os procedimentos para realização destas contagens são os mesmos descritos para contagem total de mesófilos, exceto pelo meio de cultura, ágar ferro (Lyngby) que permite a diferenciação de microrganismos produtoras de H₂S, e a temperatura de incubação a 15°C por 7 dias.

4.8 Enumeração de bactérias lácticas

A partir das diluições 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ foi feita a semeadura em alíquotas de 0,1 mL espalhadas com alça de Drigalsky na superfície de placas de ágar Man Rogosa e Sharpe-MRS (kasvi, Liofilchem, Italy). A incubação foi a 30°C por 72 horas. E os resultados foram expressos em unidade formadora de colônias (UFC/g).

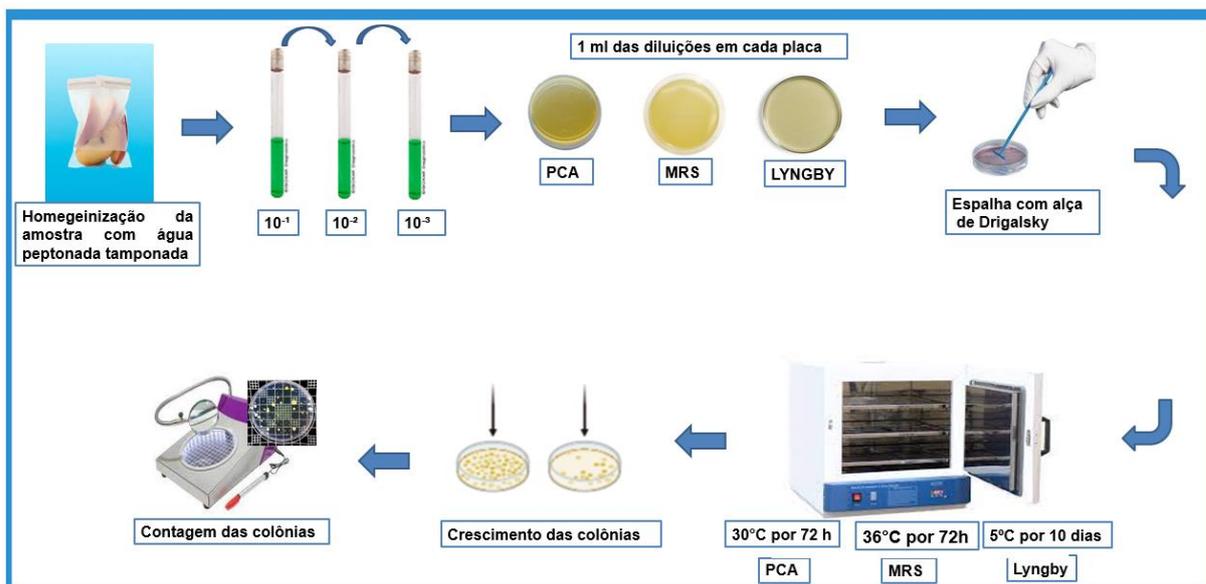


Figura 7. Esquema do procedimento utilizado para contagem dos mesófilos aeróbios, psicrotróficos totais e psicrotróficos produtores de sulfeto de hidrogênio e bactérias lácticas.

4.9 Análise físico – química

4.9.1 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

Para a determinação do pH 10g dos produtos de pescado foram adicionadas de 40 ml de água destilada, e em seguida realizando uma homogeneização. A leitura foi realizada utilizando um pHmetro digital (PHS-3E even.) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.10 Procedimento para preparo de amostras para ensaio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Uma alíquota de *ca* 1 mL da diluição 1:10 de cada amostra em água peptonada tamponada foi transferida para tubo Eppendorf, centrifugado a 2.000 rpm por 2 minutos, descartado o sobrenadante e ao pellet foi adicionado tampão fosfato (PBS) agitados em homogeneizador vórtex (velp scientific) e centrifugado novamente por mais 2 minutos a 12.000 rpm. Cinquenta µL dos pellets foram transferidos para novos tubos Eppendorf e mantidos no freezer a -20°C até o momento da análise.

4.10.1 Detecção e identificação genotípica da *Listeria sp.* e *Listeria monocytogenes*

Todas as amostras foram submetidas à análise de identificação do gênero *Listeria sp.* utilizando PCR Convencional (PCR) e PCR em Tempo Real (qPCR) para espécie *L. monocytogenes*. As extrações do DNA foram realizadas utilizando o método de extração fenol-clorofórmio para os pescados estudados e por Kit DNeasy® Blood & Tissue Kit QIAGEN para as culturas isoladas das amostras seguindo protocolo adaptado para o produto de estudo. Posteriormente foram procedidas a técnica de PCR.

4.10.2 Protocolos de extração do DNA genômico

Foram utilizados dois tipos de extrações, o primeiro procedimento realizado foi a extração do DNA (Ácido desoxirribonucleico) da própria matéria-prima, que foram o kani-kama e o

salmão defumado e fatiado de todas as amostras analisadas e o segundo foi realizado somente das amostras que cresceram colônias presuntivas de *Listeria* sp.

Para realizar a extração de DNA diretamente do alimento foi adotado o protocolo fenol-clorofórmio, utilizando 50 mg da amostra, 20 µl/mL da proteinase K, 650 de solução tampão (Tris-HCl 10 mM pH 8.0; EDTA 10 mM pH 8.0; 250 µl/mL de PBS, e homogeneizada em um Bead Beater (L-Beater 6 Locus) por 60s a 13.500 rpm e incubou a 56°C durante 1 hora com agitação a 650 rpm. A seguir foi adicionado 920 µL de fenol pH 8.0, agitado em vortex levemente e centrifugado a 14.559 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante transferido para um novo tubo contendo 500 µL de clorofórmio, agitado em vortex e centrifugado a 14.559 rpm por 10 minutos. O sobrenadante assim obtido foi transferido para um outro tubo contendo 50 µL de acetato de sódio a 3 M e pH 5.2, em seguida adicionado de 500 µL de etanol 100%, agitado em vortex e precipitado por congelamento em freezer -20 °C durante 1.5 h. Após esse tempo, o DNA foi recuperado centrifugando por 10 min a 14.559 rpm, descartado o sobrenadante, e o pellet adicionado de 500 µL de etanol 70%. O tubo foi centrifugado por 10 minutos na mesma velocidade descrita anteriormente e o excesso de etanol do pellet foi evaporado por aproximadamente 30 minutos, e eluindo em 50 µL de Tampão eluição O DNA extraído foi quantificado utilizando o Nano Drop 2000 Thermo scientific e usado como molde para cPCR e qPCR.

Para realizar o protocolo de extração a partir das colônias isoladas presuntivas de *Listeria* sp., primeiramente, uma colônia isolada de cada amostra obtida em ágar ALOA foi transferido para placas de ágar PCA e incubadas a 36°C por 24 h. No momento de iniciar a extração do DNA, as culturas foram transferidas para caldo Casoy Kasvi, incubadas a 36°C por 22 a 24 h. A seguir, 1 mL do caldo com crescimento foi transferida para tubos de Eppendorf de 1,5 ml para centrifugação a 10.500 rpm por 10 minutos, e descarte do sobrenadante. Ao pellet adicionou-se 1 ml de PBS, agitou-se em vortex para ressuspender o pellet, e esse processo de lavagem foi realizado duas vezes na mesma velocidade e tempo descrito anteriormente, sendo em seguida armazenados em freezer a -20°C até o momento da extração.

A extração foi realizada utilizando o kit DNeasy® Blood & Tissue Kit (250). O protocolo utilizado seguiu as instruções do fabricante, iniciando com a centrifugação por 5 min a 190 rpm da colônia isolada que estava em PBS, logo após, o sobrenadante foi descartado, e o pellet foi ressuspensionado em 200 µl de PBS. Posteriormente, no mesmo tubo foi adicionado 20 µl da proteinase K e 200 µl de tampão AL e colocado no vórtex para homogeneizar rapidamente, os tubos ficaram incubados a 56°C por 10 minutos no thermomixer comfort eppendorf 2 ml, após esse tempo de incubação adicionou 200 µl de etanol (96-100%) misturou-se bem utilizando o vortex. A mistura foi transferida para uma coluna da DNeasy mini e em tubos de 2 ml, centrifugou a 8000 rpm durante 1 min, descartou o tubo de fluxo e coleta e colocou em uma nova coluna e realizou a centrifugação em um novo tubo de coleta de 2 ml. Em seguida adicionou 500 µl de Buffer AW1 (primeiro tampão de limpeza) e centrifugou durante 1 min a 26000 x g descartou o tubo de fluxo e coleta colocando novamente a coluna de centrifugação em um novo tubo de coleta de 2 ml, adicionou 500 µl de tampão AW2 (segundo tampão de limpeza) e centrifugou por 3 min a 20.000 x g (14.000 rpm). Descartou o tubo de fluxo e coleta transferindo a coluna de centrifugação para um novo tubo de 1,5 ml e eluiu o DNA adicionando primeiramente 15 µl de tampão AE (tampão eluição) no centro da membrana na coluna 304L. centrifugou a 1 minuto em 8000 rpm e mais 15 µl do tampão AE foi adicionado totalizando 30 µl, em seguida foi realizado a quantificação do DNA utilizando um NanoDrop (NanoDrop™ 2000, Thermo scientific), e em consoante guardado para ser utilizado como DNA molde para o ensaio de PCR.

4.10.3 Estabelecimento do limite de detecção e preparo dos reagentes para as reações de PCR e qPCR

Para estabelecer o limite de detecção da PCR foram realizados testes com culturas puras de *Listeria monocytogenes* CLIST 02034 e CLIST 02045 em suspensões contendo quantidade decrescente de células (10^6 a 10 UFC/mL), usando como alvo a sequência do primer S2. No preparo dos reagentes para a PCR foi utilizado como base o protocolo de Paillard et al. (2003) com adaptações. Para amplificação do DNA, o volume da reação foi de 25uL, sendo 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.0 mM MgCl₂, 0,4 mM de dntp, 0,6 mM de primer 1,25 uL, 1,0 U Taq polymerase, 0.3 mM do DNA das amostras e controles.

Para a qPCR utilizou-se o protocolo de K. Rantsiou et al. (2012) com modificações. O DNA foi amplificado em uma reação, utilizando 6 uL de SYBR[®] Green PCR Master Mix, 0.4 mM de cada primer, 0,3 mM de DNA e água de PCR para completar o volume de 12 uL.

4.10.4 Amplificação dos genes

Para todos os ensaios foi utilizado o controle positivo para *L. monocytogenes* CLIST 02034 CLIST 02045, *Listeria Innocua* CLIST 02050, *Listeria Ivanovii* CLIST 02057, *Listeria Seeligeri* CLIST 02067 e água de PCR como controle negativo. Para realizar a PCR foram utilizados o par de primers S2F e S2R para o gênero *Listeria* sp. Já para a realização da qPCR foram utilizados os primers IGS1 e IGS2 para a espécie *Listeria monocytogenes*. As sequências dos referidos primers estão descritas na tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos de amplificação utilizados em PCR e qPCR.

Primers	Referência
S2F (5'-GCCTACAAGTAGTTAGAGCC-3')	Paillard et al., 2003
S2R (5'-ACTGGTACAGGAATCTCTAC-3')	
IGS1(5'-GGCCTATAGCTCAGCTGGTTA-3')	Rantsiou et al., 2012
IGS2 (5'-GCTGAGCTAAGGCCCGTAAA-3')	

Para a PCR a amplificação foi realizada no termociclador (ProFlex, Applied Biosystems) com um perfil de temperatura para desnaturação inicial fixado em 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos, cada um compreendendo uma fase de desnaturação a 94°C por 1 minuto, uma fase de anelamento a 50°C por 1 minuto e uma fase de extensão a 72°C por 1 minuto, seguida por uma fase de extensão final a 72°C por 7 minutos. Após amplificação foi realizada eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio (concentração final no gel: 0,5 µg / mL) e visualizado em transiluminador UV (Life Technologies). No caso da qPCR a reação foi realizada utilizando-se o StepONEPlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), com as seguintes condições de termociclagem: desnaturação inicial 95°C por 10 minutos, seguido por 50 ciclos, seguido de 95°C por 30s, fase de anelamento a 54°C por 30s, e anelamento a 72°C por 30s.

4.10.5 Análise da sensibilidade analítica da técnica

A sensibilidade analítica da PCR foi avaliada através do uso de suspensões contendo quantidade decrescente de células (10^6 a 10 UFC/mL) do DNA total extraído das cepas CLIST 02034 e CLIST 02045. O DNA extraído da bactéria foi submetido aos ensaios de PCR desenvolvidos neste estudo. Esse produto também quantificado. Para determinar o número de cópias de cada ponto da diluição, foi imprescindível realizar o cálculo de estimativa conforme

a equação a seguir, usado a quantidade de genoma total da *Listeria monocytogenes* para aplicação do mesmo.

$$\text{Número de cópias} = \frac{6,02 \times 10^{23} \text{ (cópias por mol)} \times \text{Concentração de DNA (g)}}{\text{tamanho do alvo (pares de base)} \times 660 \text{ (g/mol/bp)}}$$

O número de cópias variou de 1 a 1×10^6 por μL , com sete séries de diluições separadas realizadas para cada ponto da curva.

Para a qPCR o número de cópias variou com sete suspensões em quantidade decrescente de células 10^6 a 10^2 por μL e para cada ponto da curva foi realizado em triplicata. A regressão linear, juntamente com o coeficiente de determinação (R^2) formado após a determinação de cada ponto da curva, pode ser utilizado para avaliar se o ensaio de qPCR foi otimizado.

4.10.6 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio do software Graphpad Prism versão 7 (La Jolla, California, EUA). Todos os resultados estão demonstrados pelo valor da média \pm erro padrão. Para análise estatística foi utilizado o método ANOVA de duas vias, seguidas do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Detecção de *Listeria* sp. em kani-kama

Inicialmente determinou-se o limite de detecção da *Listeria* sp. por PCR usando a sequência do primer S2. Verificou-se um limite de detecção de 10 cópias de alvo contendo o gene da *L. monocytogenes*, como pode ser visualizado na (Figura 8).

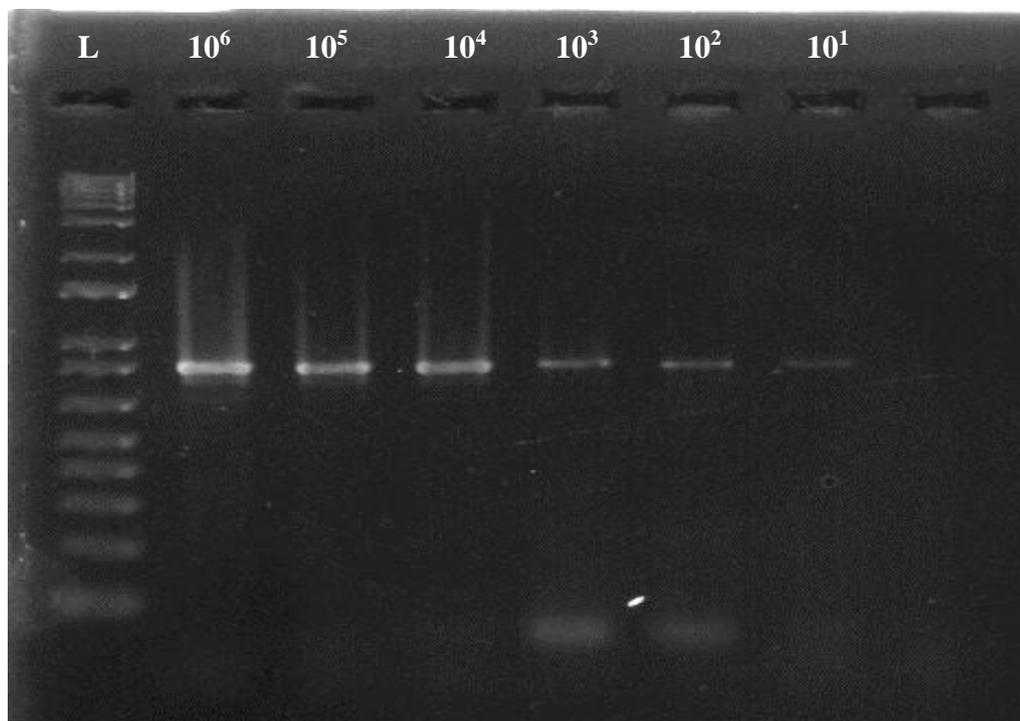


Figura 8. Limite de detecção de *Listeria* sp. A suspensão contendo 10⁶ UFC/mL corresponde a maior quantidade de gene alvo e a 10 UFC/mL o menor número de células detectável pelo gene alvo. O Poço L corresponde ao marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen®).

No presente estudo foram realizados dois tipos de extrações, direto das matrizes alimentar que foram o kani-kama e salmão defumado e fatiado e das colônias presuntivas de *Listeria* que cresceram no meio de cultura ALOA, sendo que a banda correspondente ao gene de *Listeria* sp é de 890 pares de bases (Figura 9).

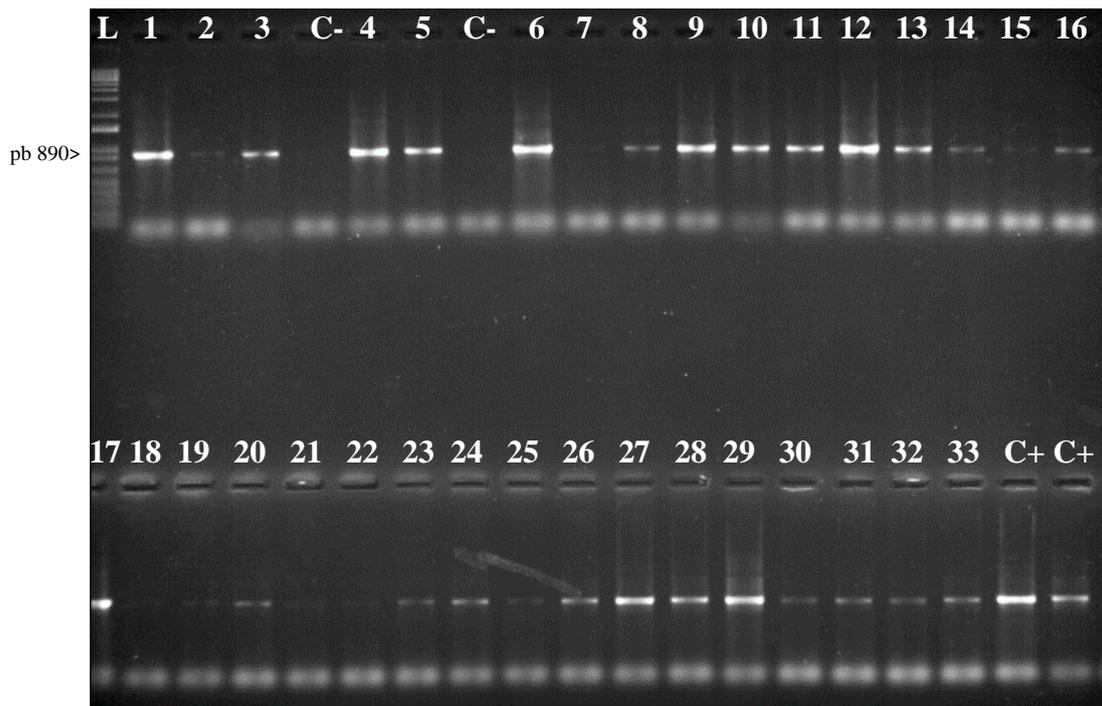


Figura 9. Gel de eletroforese de ensaio de PCR para a detecção do gene alvo da *Listeria* sp., utilizando oligonucleotídeos S2R e S2F. Fragmentos de DNA amplificados a partir da extração do kani-kama. Poços com C+ e C- são os controles positivos e negativos respectivamente, os outros poços com numerações correspondem as amostras de kani-kama que foram positivas e tem (890pb). E o Poço L corresponde ao marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen®).

De um total de 72 amostras de kani-kama 23,6% testaram positivas para *Listeria* sp por cultivo Figura 10-A, enquanto 45,8% foram positivas por PCR (Figura 10-B). Observou-se que o método molecular mostrou um nível de detecção mais alto, com sensibilidade para detectar o gene alvo da *Listeria* sp. mesmo em baixo nível de contaminação na amostra, ou as células de *Listeria* sp poderiam estar viáveis, mas não cultiváveis, por isso não foram detectadas por cultivo. Verificou que todas as marcas apresentaram pelo menos uma amostra, contaminada com *Listeria* sp. no momento em que foram adquiridas no comércio (tempo zero). O tempo total de validade comercial do produto são dois anos de manutenção congelada. Entretanto ao serem adquiridas com um ano de vida útil, já apresentaram contaminação com *Listeria* sp em níveis detectáveis pelos métodos de cultivo e PCR (Figura 10). Nos produtos de kani-kama das marcas kani 1 e kani 2 o número de amostras contaminadas aumentou com o armazenamento refrigerado, no entanto, nas amostras de kani 3 este aumento só foi observado pela técnica de PCR.

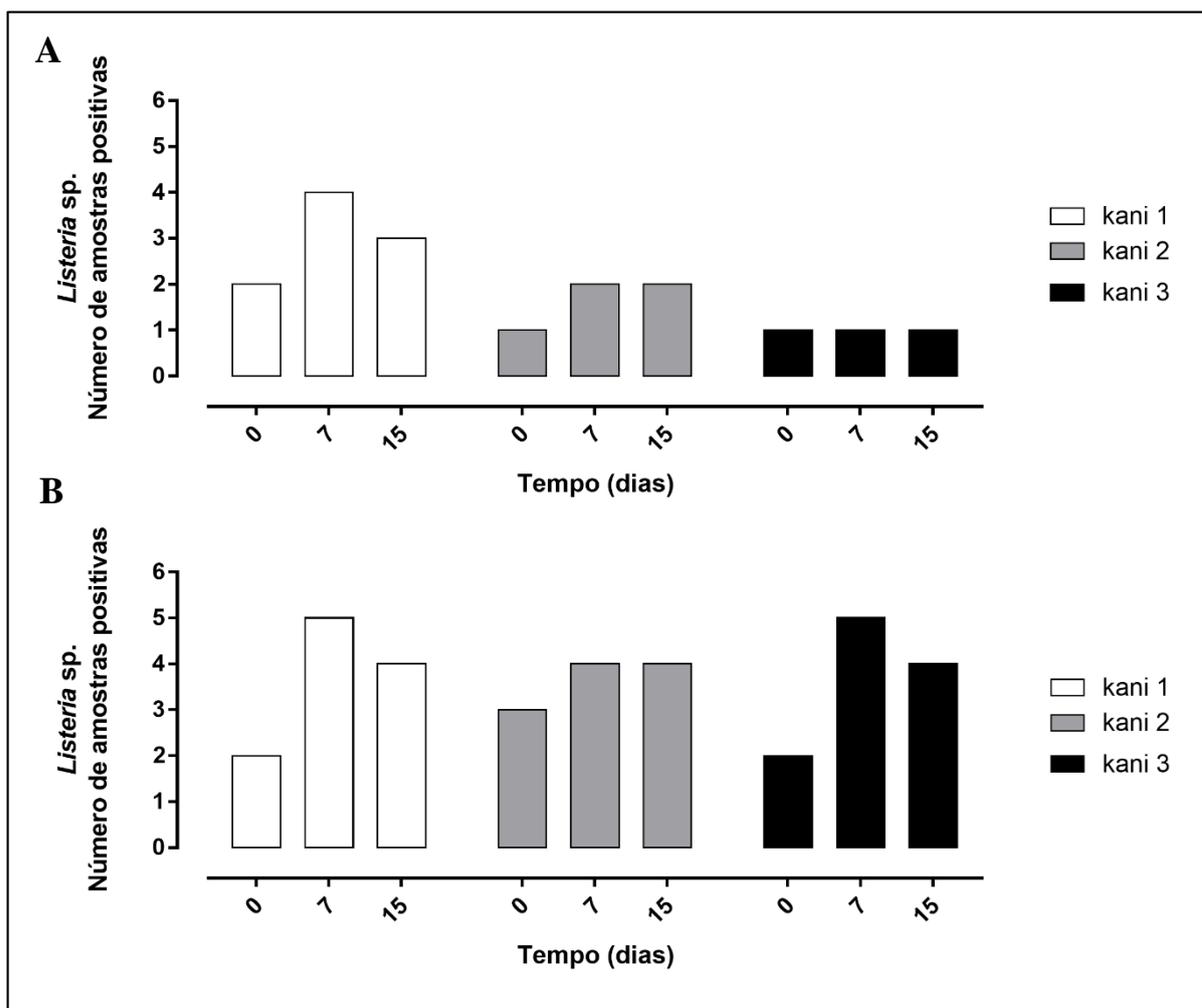


Figura 10 Presença de *Listeria* sp. detectado por cultivo (A) e por PCR (B) em três diferentes marcas de kani-kama, analisados no dia da aquisição tempo (zero) e após 7 e 15 dias armazenado a 5°C.

Mazzitta (2001) mostrou que a possibilidade de conter microrganismos após as etapas de cozimento e após inserir o kani-kama na embalagem é muito baixo. Entretanto pode ocorrer contaminação após o processo, sendo a pasteurização no produto final embalado a vácuo um controle bastante correto para prevenir o desenvolvimento da *L. monocytogenes*. Em estudo desenvolvido pelo mesmo autor verificou-se que aplicando temperatura de 71,1°C por 15s, resultou na inativação de 5 logs da *L. monocytogenes* mostrando-se um binômio ideal para o produto estudo. Entretanto a temperatura mais usual para pasteurização de frutos do mar incluindo o análogo de caranguejo (kani-kama) é 85°C no ponto central (RIPPEN; HACKNEY, 1992), sendo o tempo de 0,06 s necessário para inativar 5 logs (MAZZOTTA, 2001).

O percentual de amostras positivas para *Listeria* sp. das três marcas comerciais é mostrado na (Figura 11-A). O número de amostras contaminadas dos três fabricantes foi similar, sendo ligeiramente menor do kani 1, e conclui-se que as práticas higiênicas de fabricação empregadas nos produtos de diferentes marcas é muito similar. Quando analisado o percentual total de amostras positivas das três marcas comerciais nos diferentes tempos (Figura 11-B), observa-se o menor número de amostras positivas no tempo zero, indicando que durante o processo ocorreu falha na pasteurização do kani-kama embalado e quando armazenado refrigerado pode ter propiciado a multiplicação de *Listeria* sp. a níveis detectáveis já nos primeiros sete dias sob refrigeração.

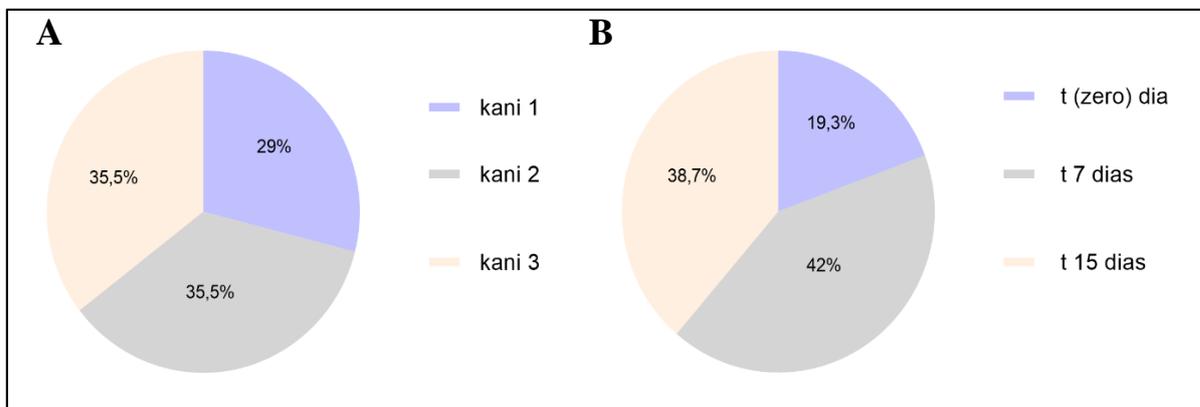


Figura 11. Distribuição do Percentual de amostras de kani-kama positivas para *Listeria* sp. detectadas por PCR, entre as diferentes marcas comerciais (A) e durante os tempos amostrados (B) de (zero), 7 e 15 dias sob refrigeração a 5°C.

As amostras de kani-kama foram coletadas em diferentes estabelecimentos localizados no município do Rio de Janeiro, na região metropolitana, baixada fluminense e região norte fluminense, sendo possível verificar diferentes condições de estocagem, dependendo da localidade onde a amostra foi adquirida. Em muitos casos foi verificado que o produto de pescado pronto para consumo encontrava-se descongelado em temperatura de refrigeração, junto com outros tipos de produtos cárneos em freezer aberto, sendo mais evidentes nos municípios da baixada fluminense. Coincidentemente, foram justamente essas amostras que apresentaram alta contaminação microbiana, provavelmente durante o processo para obtenção do kani-kama ocorreu falhas, e não eliminou toda carga microbiana que estava presente e conseqüentemente durante o tempo de vida útil em temperatura inadequada ocorreu o crescimento da *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes*. Por outro lado, as amostras coletadas em supermercados com acondicionamento específico para os pescados, onde estes eram mantidos em temperatura mais baixa, os produtos apresentaram maior segurança com uma menor ocorrência de amostras contaminadas com *Listeria* sp.

Em ágar Ottaviani e Agosti (ALOA) todas as *Listeria* spp. produzem colônias azul turquesas e as espécies patogênicas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* aparecem cercadas por uma zona de precipitação distinta. Ottaviani et al. (1997) combinou este sistema de detecção com substrato cromogênico 5-Bromo-4 cloro-3-indolil- β -D-glicopiranosídeo, para atividade de β -D-glicosidase. Vários microrganismos apresentam atividade de β -D-glicosidase. Entre os Gram positivos, além de *Listeria* sp, *Enterococcus* sp, *Bacillus* sp.

O presente estudo, evidenciou que 12,5% das amostras estudadas que apresentaram colônias verde azuladas presuntivas de *L. monocytogenes* ou *Listeria* sp. no meio de cultura ALOA, revelou tratar-se, no entanto, de bactérias Gram positivas de outros gêneros (Figura 12).

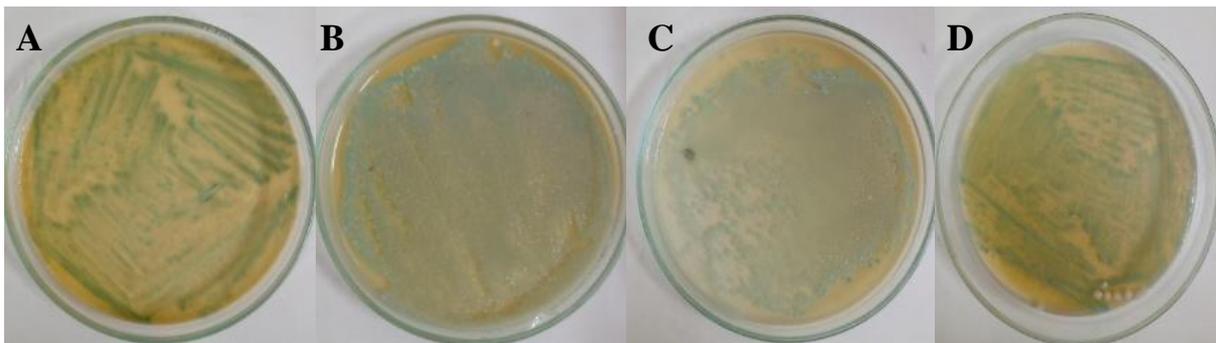


Figura 12. Placas de ágar ALOA com colônias que correspondem a bactérias Gram positivas de gêneros interferentes. As imagens (A e B) são de colônias que cresceram nas amostras de kani-kama e (C e D) no salmão defumado e fatiado.

No estudo desenvolvido por Angelidis; Kalamaki; Georgiadou (2015) os autores fizeram um levantamento de quais microrganismos conseguem crescer no ágar ALOA, em que a morfologia das colônias de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* verdes azuladas muito semelhantes foram observadas com microrganismos identificados a outros seis gêneros e 12 espécies bacterianas que são: *Bacillus* spp. (*B. circulans*, *B. clausii*, *B. licheniformis* e *B. oleronius*), *Cellulosimicrobium* spp. (*C. funkei*), *Enterococcus* spp. (*E. faecalis*, *E. faecium/ durans*), *Kocuria* spp. (*K. kristinae*), *Marinilactibacillus* spp. (*M. psychrotolerans*), *Rothia* spp. (*R. terrae*), *Staphylococcus* spp. (*S. sciuri* e *S. saprophyticus subsp. saprophyticus/xylosus*) e *Cellulosimicrobium* spp. Os mesmos autores ressaltam que a formulação do ALOA deve ser melhorada para inibir o crescimento de microrganismos que possam induzir a resultado falso positivo, e conseqüentemente aumentar a eficiência dos resultados fenotípicos.

Além disso, os *Bacillus* spp. e *Enterococcus* spp. são microrganismos Gram positivos e apresentam-se como bacilos curtos e cocos respectivamente, características morfológicas semelhantes a *Listeria* sp. dificultando muito a diferenciação entre estas bactérias. *Bacillus* spp. em especial *B. subtilis* que formam colônias azuis turquesa, sendo muito parecido morfológicamente com *L. monocytogenes* com o crescimento de colônias são verdes azuladas com halo distinto. Estafilococos também tem a capacidade de crescer no meio de cultura ALOA junto com colônias atípicas de *L. monocytogenes* (STESSL et al., 2009) Mahgoub et al., (2022) também encontraram *Bacillus safensis*, *B. oceanobacillus* *B. picturae* e *B. wiedmannii* que se desenvolveram no meio ALOA e apresentam as mesmas características dos microrganismos descritos anteriormente.

5.2 Detecção de *L. monocytogenes* em kani-kama

A detecção de *L. monocytogenes* utilizando o método de qPCR permitiu um limite de detecção de 100 cópias (Figura 13). O coeficiente de determinação foi 0,991, o que é muito próximo do ótimo ideal teórico 1,0. A eficiência da reação foi de 114.108. O número de ciclos de quantificação (Cq) variou de 20,68 ciclos na primeira suspensão contendo (10^6 UFC/mL) para 32,15 ciclos na última suspensão (100 UFC/ml) Figura 13. Apesar da técnica de qPCR apresentar maior sensibilidade, o limite de detecção foi mais alto que aquele verificado para detecção do gênero *Listeria* sp. por PCR onde detectou até 10 cópias do gene alvo, provavelmente devido a eficiência do primer utilizado.

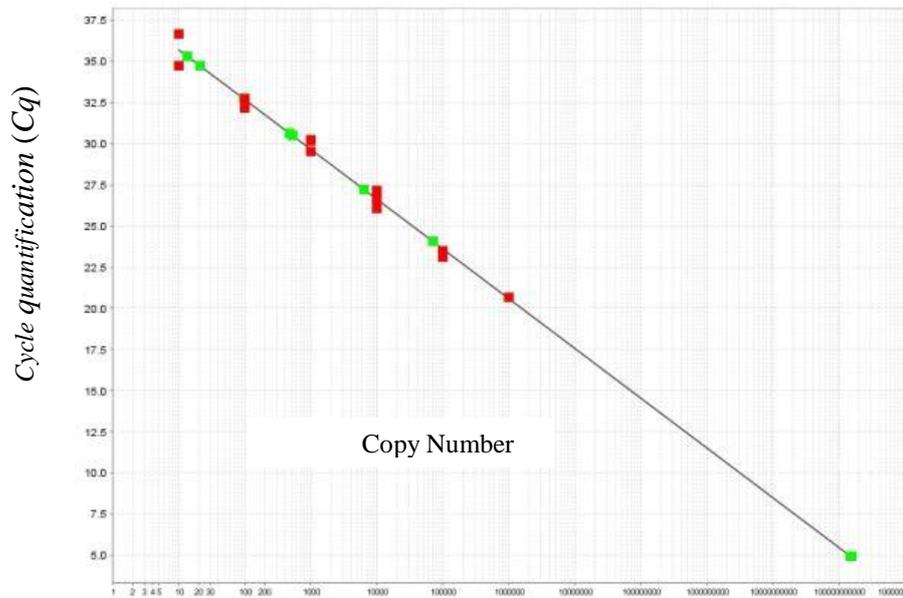


Figura 13. Curva padrão para determinação do limite de detecção a partir de diluições decimais em série usando a cepa 02045 *L. monocytogenes*. O valor do ciclo de quantificação (Cq) obtido pela reação em cadeia da polimerase em tempo real usando a tecnologia SYBR com uma função do número inicial de cópias alvo.

A curva de dissociação do fragmento da *L. monocytogenes* amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real, utilizando como controle positivo a cepa *L. monocytogenes* CLIST 02045, mostrou temperatura de melt (T_m) de aproximadamente 81°C sem presença de pico de dimerização, como pode ser observado na (Figura 14).

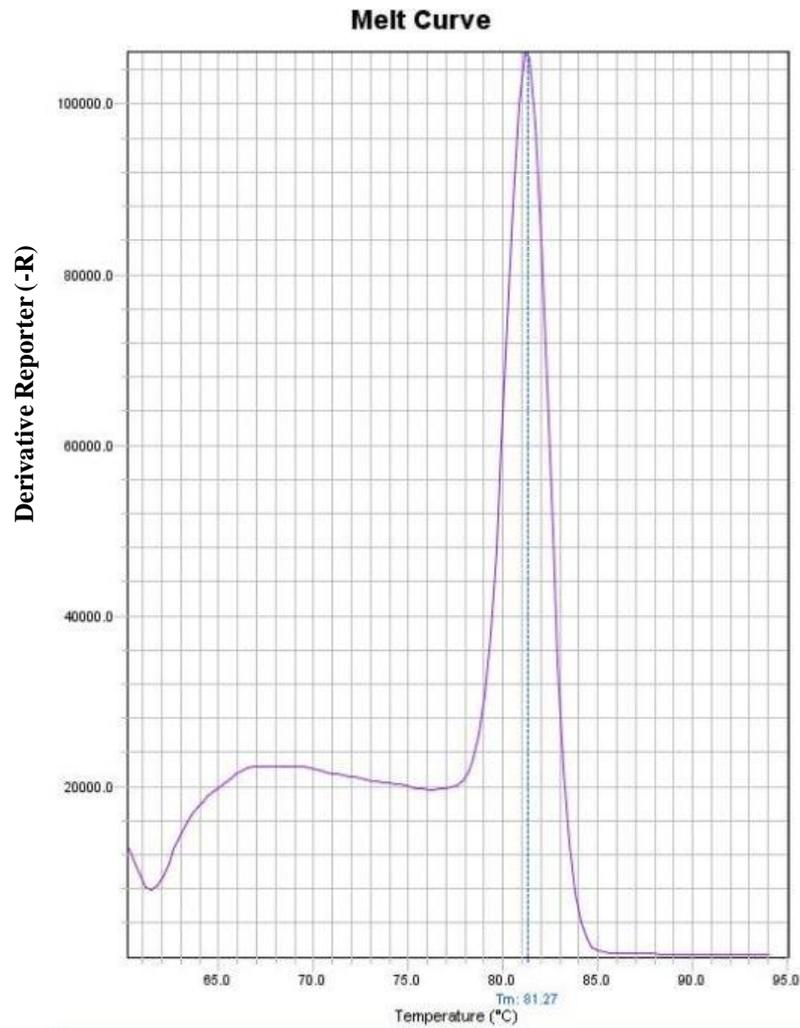


Figura 14. Curva de dissociação do fragmento da *L. monocytogenes* amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) da cepa CLIST 02045.

Com relação a *Listeria monocytogenes*, três (4,2%) das amostras de kani-kama de um total de 72 amostras testaram positivas para todos os testes fenotípicos mandatórios da ISO 11920-2: 2020, como beta-hemólise, L-ramnose positivo, D-xilose negativo, Gram positivo e catalase positiva realizado como teste complemento. As placas com colônias das três amostras de diferentes lotes no kani-kama que testaram positivas para *L. monocytogenes* são mostradas na (Figura 15), sendo duas da marca kani 3 e uma da marca kani 1, com 7 e 15 dias de armazenamento a 5°C.

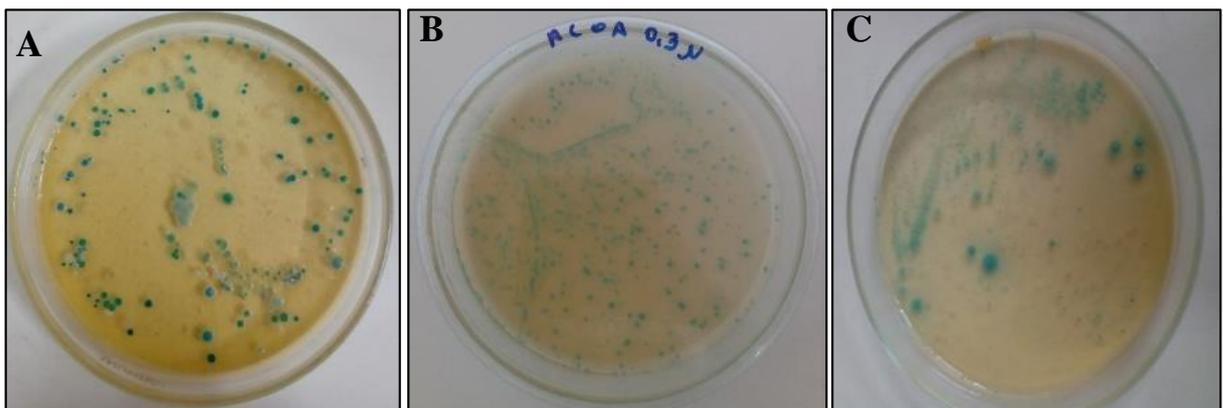


Figura 15. Placas de ágar ALOA das amostras de kani-kama confirmadas positivas para *Listeria monocytogenes*. Sendo (A) e (C) da marca kani 3 e (B) da marca kani 1.

A morfologia de bacilos/cocos curtos da cepa de *Listeria monocytogenes* isolada da amostra de kani-kama em comparação com a cepa *L. monocytogenes* CLIST 02045 pode ser observada na (Figura 16).

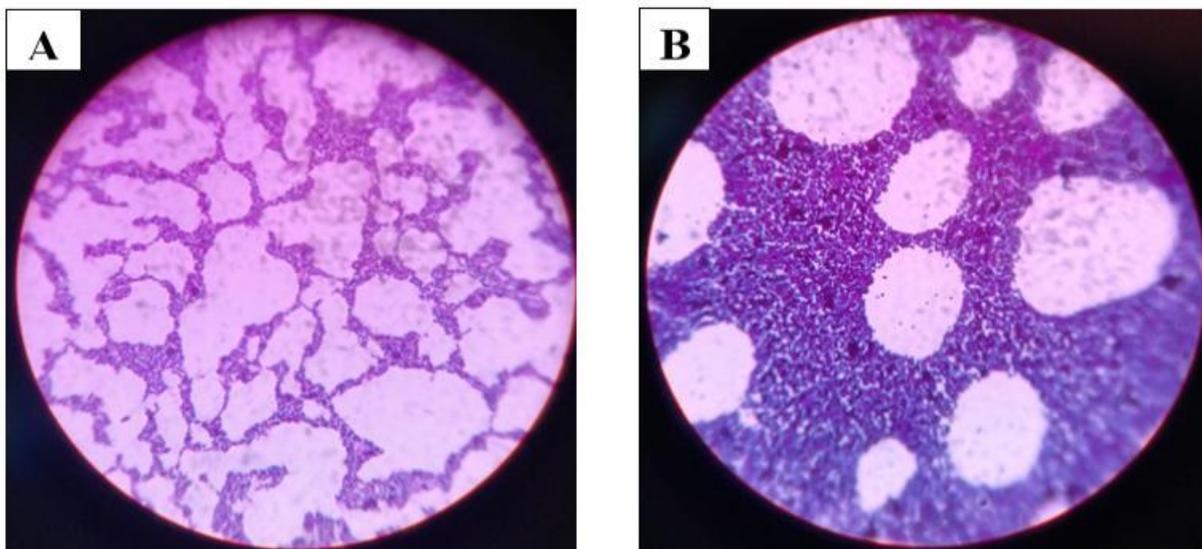


Figura 16. Coloração de Gram de *L. monocytogenes* cepa CLIST 02045 (A) e *L. monocytogenes* da amostra de kani-kama (B). Aumento 1000 x..

Fonte: própria autora, 2022.

Aplicando a técnica qPCR para detectar a espécie *L. monocytogenes* foi observado 21 amostras de kani-kama positivas (29,2%) de um total de 72, sendo 5 amostras positivas no tempo zero, 8 após 7 dias e 8 com 15 dias de armazenamento a 5°C (Figura 17). Constatou-se que entre todas as amostras analisadas pelo menos uma amostra estava positiva para o patógeno nos diferentes tempos. A alta prevalência do patógeno nos produtos de pescado pronto para consumo que não passarão por aquecimento adicional antes de serem consumidos evidência um risco para o consumidor. Não foi realizada a quantificação das amostras por qPCR, entretanto o nível de detecção da técnica foi de 100 cópias de *L. monocytogenes*. De acordo com os padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2022) o número máximo tolerado de *L. monocytogenes* nestes produtos de pescado é de 100 UFC/g. Conforme pode ser observado na (Figura 17) a marca kani 1 apresentou aumento de amostras contaminadas com 15 dias de armazenamento se comparado com os tempos 0 e 7, enquanto nas outras duas marcas o aumento no número de amostras contaminadas com *L. monocytogenes* já foi observado a partir do 7º dia de armazenamento refrigerado.

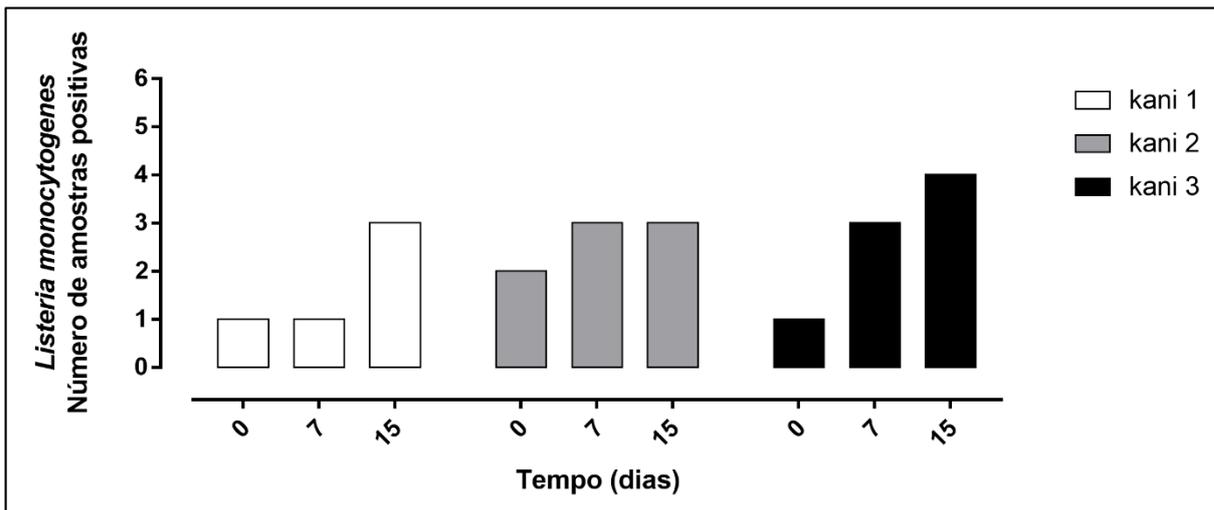


Figura 17. Presença de *Listeria monocytogenes* detectado por qPCR em diferentes marcas de kani-kama no momento da aquisição (tempo zero) e ao longo do armazenamento refrigerado a 5°C por 7 e 15 dias.

Segundo os autores Farber; Peterkin, (1991), Cabedo et al. (2008) e González et al., (2013) é baixa a incidência do patógeno *L. monocytogenes* em análogos de caranguejo (kani-kama) garantindo que seja um alimento pronto para consumo de alta qualidade do ponto de vista higiênico sanitário. Entretanto, os resultados encontrados no presente estudo revelam possíveis falhas no processo, seja na produção ou na cadeia de frio, mesmo sendo o kani-kama pasteurizado dentro da embalagem a vácuo.

Contaminação durante o processo pode ter contribuído para a presença da *Listeria monocytogenes* no produto final, a falha pode ter ocorrido no binômio tempo temperatura aplicado na etapa de pasteurização do kani-kama que não foi suficiente para eliminar todos os microrganismos presentes no produto, sendo importante ressaltar que a *Listeria sp.* não produz esporos e o kani-kama já é pasteurizado dentro da embalagem e durante o tempo de estocagem com temperatura inadequada as amostras de kani-kama foram encontradas nos supermercados descongeladas ou em temperatura de refrigeração, sendo uma condição muito discrepante do que estava especificando nos rótulos das embalagens, em que a temperatura adequada para o acondicionamento deveria ser de -18°C. Sendo assim, é uma condição preponderante para o desenvolvimento de bactérias patogênicas, principalmente a *L. monocytogenes* que tem a capacidade de desenvolvimento mesmo em temperatura de refrigeração (SHIN; KANG; RASCO, 2008; MATTHEWS et al., 2017).

É importante ressaltar, que apenas uma das marcas analisadas descrevia no rótulo que todo o alimento deveria ser consumido depois do descongelamento. A variação de temperatura com frequência nos produtos de pesca prontos para consumo também pode prejudicar as características sensoriais por favorecer o crescimento de microrganismos deteriorantes que produzem odores indesejáveis (LEROI et al., 1998; HANSEN; RØNTVED; HUSS, 1998) deixando o produto inviável para consumo.

Um pequeno surto ocorrido no Canadá, relacionado com o consumo de análogo de caranguejo (kani-kama) contendo alta quantidade de células de *L. monocytogenes*, sendo 10⁶ UFC/g foi registrado envolvendo duas pessoas adultas saudáveis. Os autores relataram que o kani-kama pode ter sido armazenado por um longo tempo em temperatura acima de 10°C, o que pode ter favorecido o rápido crescimento da *L. monocytogenes*. Para prevenir a disseminação de doenças de origem alimentar envolvendo produtos prontos para consumo, é necessário que a matéria-prima utilizada para produção do kani-kama tenha baixo nível de contaminação inicial para evitar aumento de contaminação durante o processamento, como também é fundamental que durante todas as etapas do processo seja aplicado controle de

qualidade adequado para garanti eliminação total de carga microbiana, principalmente os microrganismos que possam está presente no produto final, pois se ocorrer falha em alguma etapa, como por exemplo, na pasteurização em que o binômio tempo temperatura não seja aplicado corretamente, o patógeno continuará no pescado e se durante o tempo de armazenamento ocorrer variação brusca de temperatura pode favorecer o crescimento de patógeno, principalmente da *Listeria monocytogenes* que consegue crescer em temperatura de refrigeração. Outrossim, os produtos que deveriam estar congelados conforme descrições do fabricante, encontravam-se sob refrigeração comprometendo a vida útil do alimento (FARBER et al., 2000).

5.3 Contagem de *Listeria* sp e *L. monocytogenes* em kani-kama

As contagens realizadas em ágar ALOA para *Listeria* sp. e *L. monocytogenes* com confirmação por PCR e qPCR respectivamente, são mostradas na (Figura 18). Todas as três marcas apresentaram níveis quantificáveis do microrganismo mesmo no tempo zero. A marca kani 1 no tempo de 7 dias de armazenamento a 5°C apresentou a maior média de contagem $2,0 \pm 1,1$ Log UFC/g de *Listeria* sp., se comparado com as marcas kani 2 e kani 3 nos diferentes tempos analisados Figura 18-A. Para *Listeria monocytogenes*, nenhuma amostra ultrapassou o limite máximo de 2 Log (10^2 UFC/g) (Figura 18-B) estando todas dentro dos padrões microbiológicos para alimentos que determina o máximo de 100 UFC/g de *L. monocytogenes* em produtos alimentícios pronto para consumo (BRASIL, 2022).

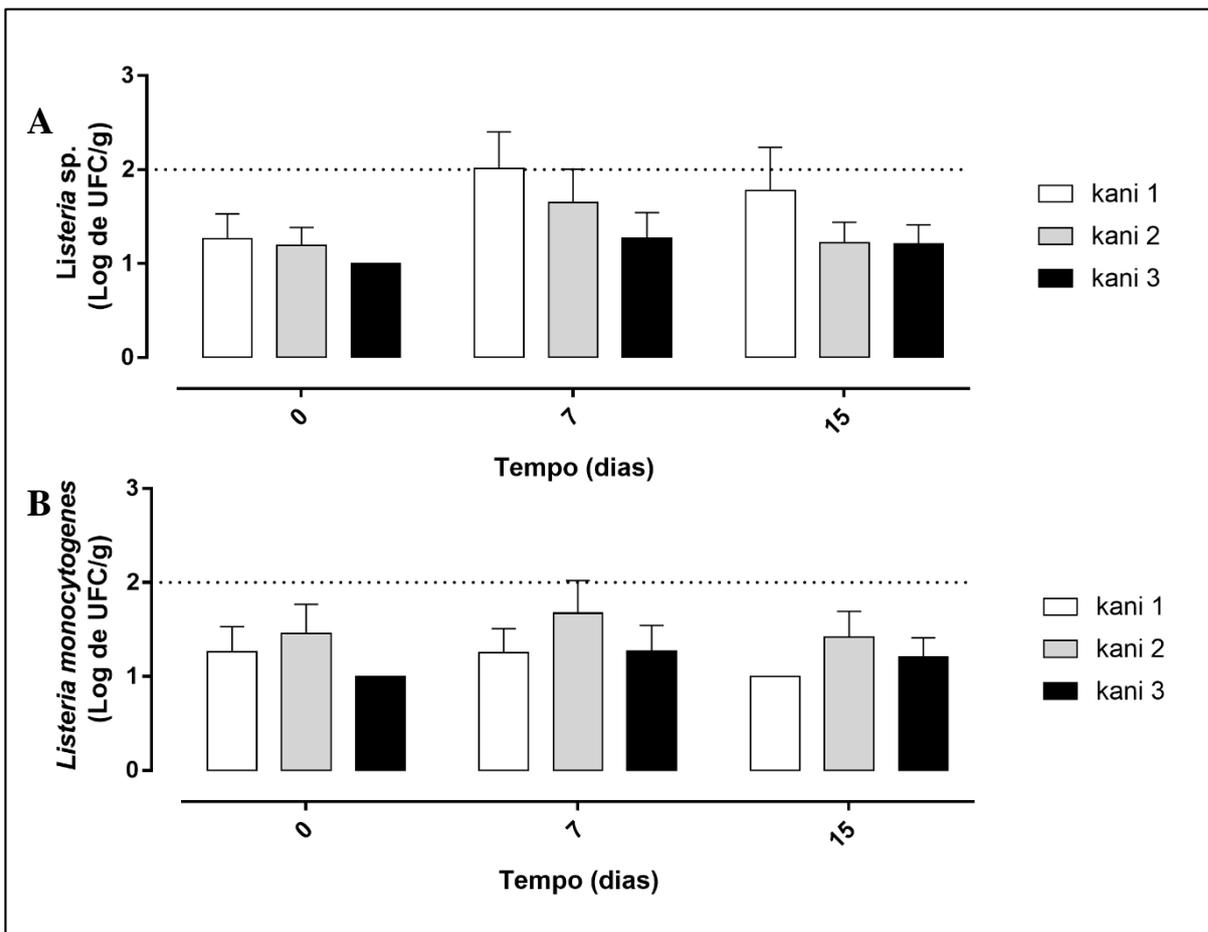


Figura 18. Médias e desvio padrão da contagem da *Listeria* sp. (A) e *Listeria monocytogenes* (B) em kani-kama no dia da aquisição (tempo 0) e após 7 e 15 dias armazenado a 5°C. As contagens foram

feitas em ágar ALOA e a confirmação por PCR e qPCR. Para fins de cálculo, contagens < 1 Log de UFC/g, foram consideradas 1.

5.4 Detecção de *Listeria sp.* em salmão defumado e fatiado

Todas as 48 amostras de salmão defumado e fatiado, foram analisadas quanto a presença de *Listeria sp.* por PCR utilizando os oligonucleotídeos S2R e S2F, como mostrado na (Figura 19) em que 27 amostras (56,2%) testaram positivas para *Listeria sp.*

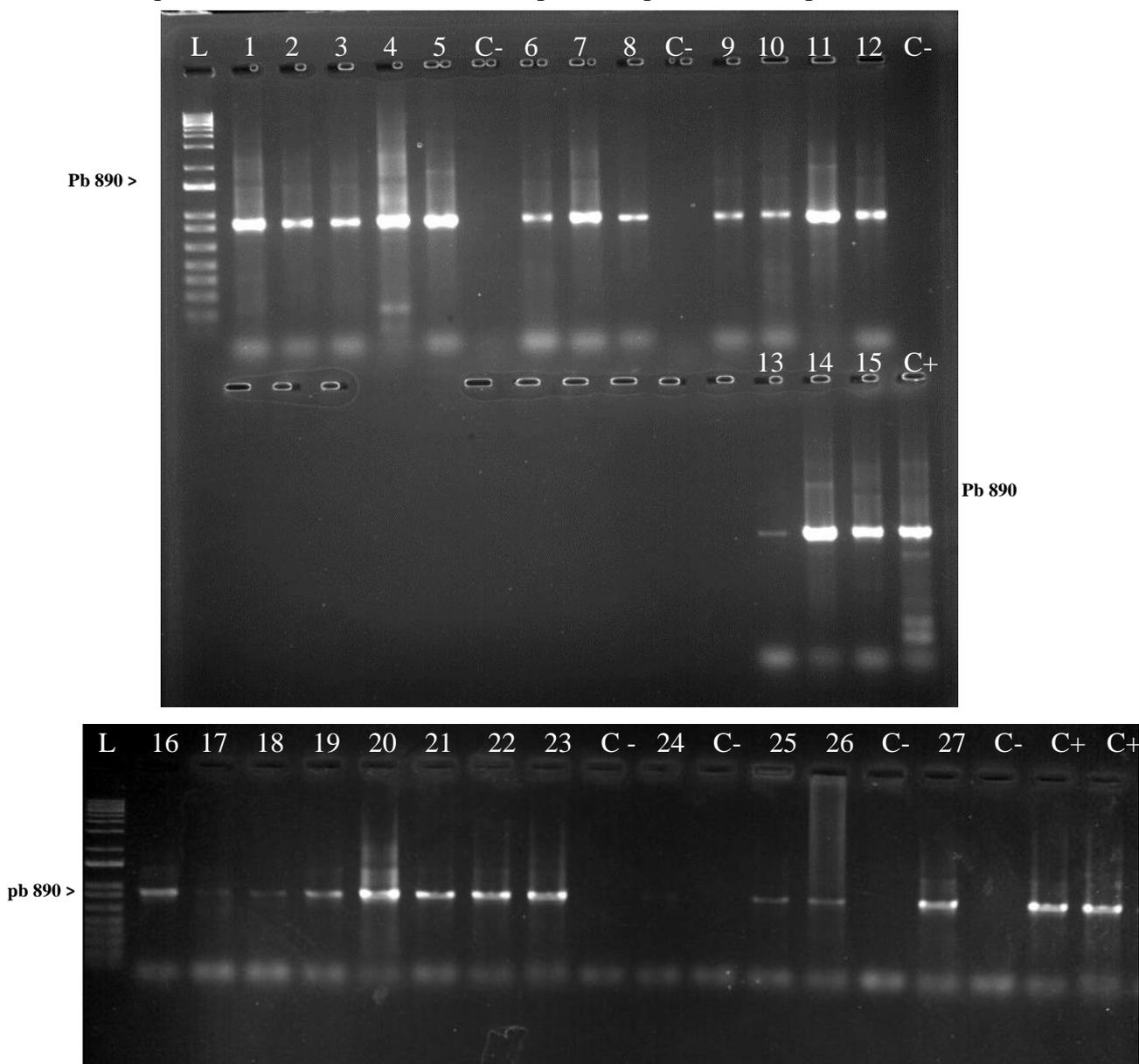


Figura 19. Gel de eletroforese de ensaio de PCR para a detecção do gene alvo da *Listeria sp.*, utilizando oligonucleotídeos S2R e S2F. Fragmentos DNA amplificados a partir da extração do salmão defumado e fatiado. Poços com C+ e C- são os controles positivos e negativos respectivamente, os outros poços com numerações corresponde amostras de salmão defumado e fatiado que foram positivas e tem (890pb). E o Poço L corresponde ao marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen®).

De um total de 48 amostras de salmão defumado 16 amostras foram positivas para *Listeria sp.*, sendo o percentual de amostras detectadas positivas pelo método de cultivo, de 33,3% conforme ilustrado na (Figura 20-A), enquanto 27 amostras (56,2%) foram positivas

entre as amostras analisadas por PCR com extração direta da matriz alimentícia apresentado na (Figura 20-B). Portanto, a técnica PCR mostrou maior sensibilidade se comparado com o método tradicional de cultivo.

Com relação a detecção de *Listeria sp.* em salmão defumado e fatiado, constatou-se que todas as marcas apresentaram amostras positivas, no momento da aquisição no comércio (tempo zero) e após 30 dias de armazenamento a 5°C. A marca SDe 2 apresentou maior quantidade de amostras positivas no tempo 30 quando comparado com as outras marcas e tempos analisados no método de cultivo (Figura 20-A). Quando foi realizada a confirmação por PCR a marca SDe 1 no tempo zero que tinha apenas uma amostra positiva pelo método de cultivo, apresentou seis amostras positivas. De modo geral, foi detectado maior quantidade de amostras positivas pela técnica de PCR (Figura 20-B). Verificou-se também, que todas as amostras assim que adquiridas no comércio e analisadas já apresentavam contaminação com *Listeria sp.*, provavelmente por falhas no controle qualidade do produto ou armazenamento inadequado durante o tempo de estocagem nos supermercados de comercialização.

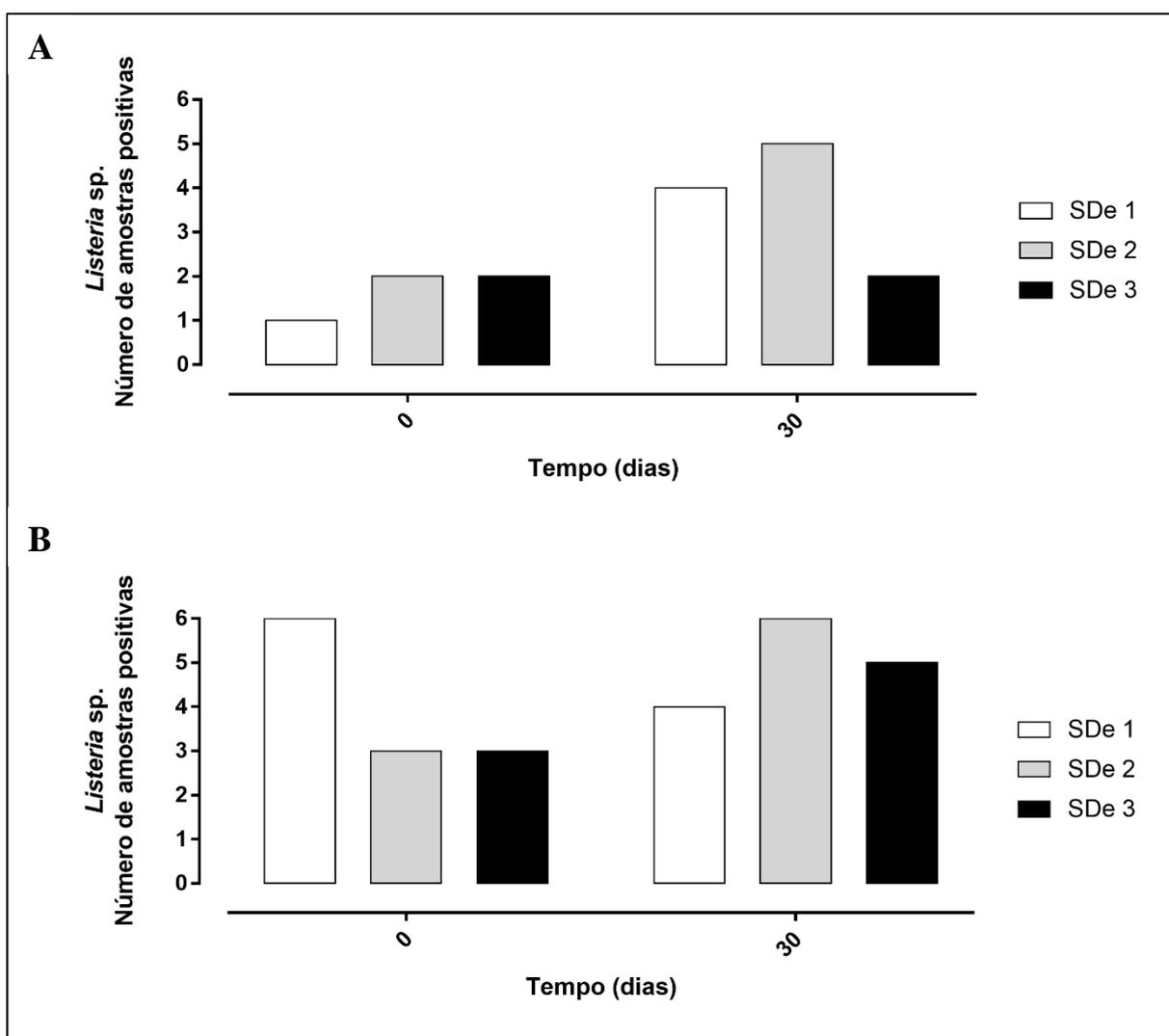


Figura 20. Presença de *Listeria sp.* detectado por cultivo (A) e PCR (B) em diferentes marcas de salmão defumado e fatiado no momento da aquisição (tempo zero) e ao longo do armazenamento refrigerado a 5°C por 30 dias.

Comparando o número de amostras positivas para *Listeria* sp entre as três marcas analisadas, é possível verificar incidência semelhante entre elas, sendo ligeiramente maior na marca SDe1 que atingiu 37% (Figura 21-A). Dentre os tempos analisados (zero) dia e 30 dias de armazenamento a 5°C, foi observado maior quantidade de amostras positivas após 30 dias, comprovando que ocorreu crescimento de *Listeria* sp. durante o armazenamento, e que a cadeia do frio tem que ser aplicada de forma correta como descrito nas embalagens dos produtos de pescado prontos para consumo para evitar o crescimento de microrganismos que possam comprometer a integridade e sanidade do produto (Figura 21-B).

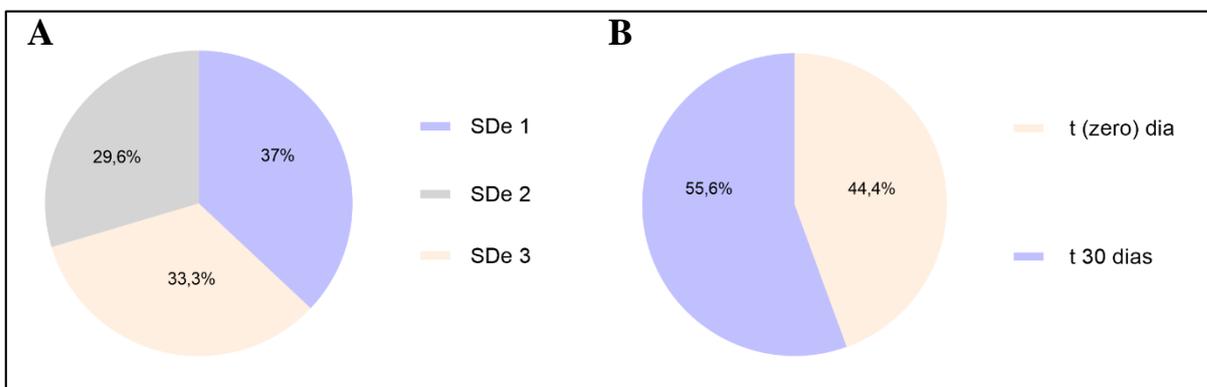


Figura 21. Distribuição do Percentual de amostras de salmão defumado e fatiado positivas para *Listeria* sp. detectadas por PCR, entre as diferentes marcas comerciais (A) e durante os tempos amostrados (B) de (zero) e 30 dias sob refrigeração a 5°C.

5.5 Detecção de *L. monocytogenes* em salmão defumado e fatiado

No desenvolvimento da qPCR para detecção de *L. monocytogenes*, a curva de dissociação de uma amostra de salmão defumado e fatiado positiva para *L. monocytogenes*, verificou-se temperatura de melt de aproximadamente 81°C sem a presença de pico de dimerização (Figura 22).

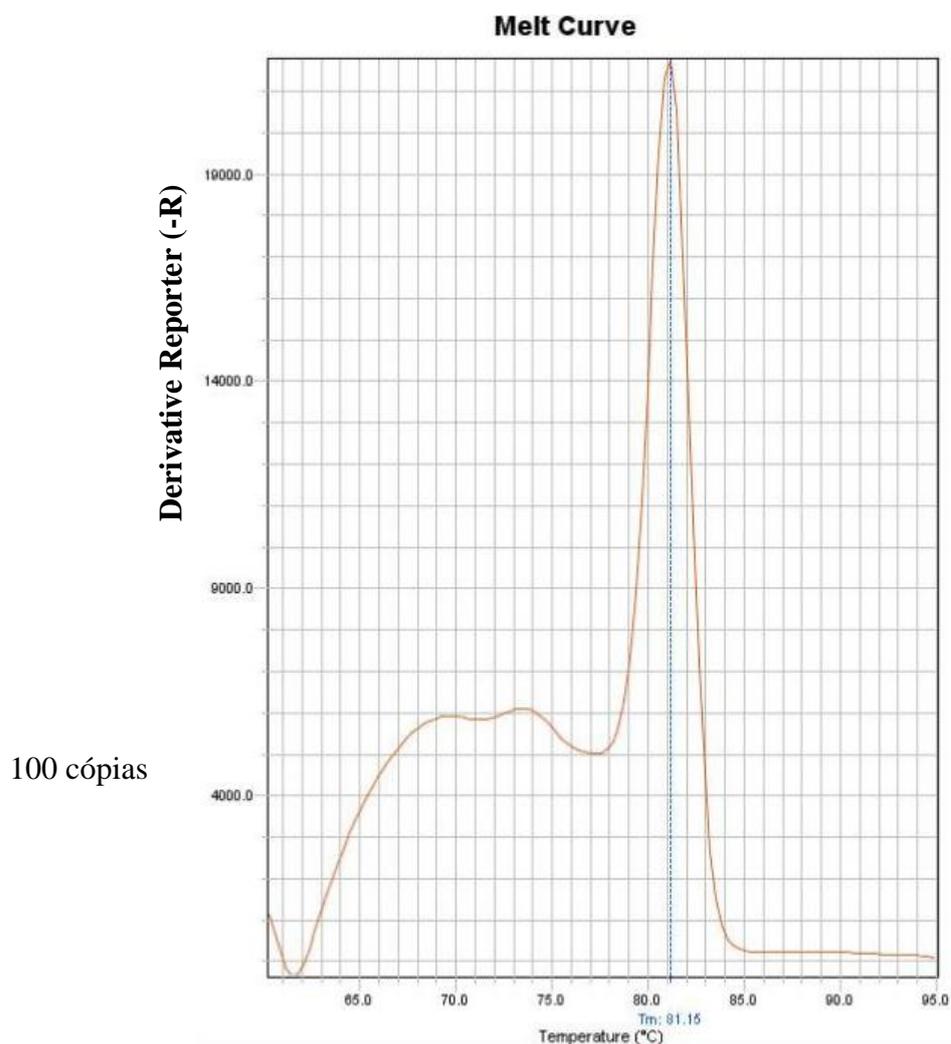
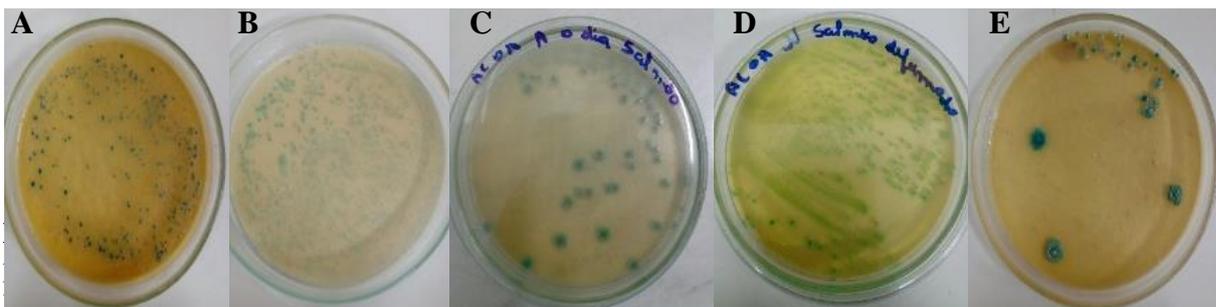


Figura 22. Curva de dissociação do fragmento de *L. monocytogenes* amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) da amostra de salmão defumado e fatiado.

Das 48 amostras de salmão defumado e fatiado analisadas, 5 amostras (10,4%) testaram positivas para *L. monocytogenes* em todos os testes fenotípicos realizados e descritos anteriormente. Na (Figura 23) todas as imagens contêm colônias que cresceram em meio ALOA e confirmaram para o patógeno, e correspondem a cinco amostras de diferentes lotes de salmão defumado e fatiado. Sendo **A** e **D** analisadas no tempo (zero) que foi o dia da aquisição e **B**, **C** e **E** com 30 dias de armazenamento a 5°C.



A detecção de *L. monocytogenes* utilizando a técnica qPCR mostrou-se mais sensível que por cultivo. De um total de 48 amostras de salmão defumado e fatiado analisadas, 23 amostras (47,9%) testaram positivas para o patógeno, sendo 12 no (tempo zero) e 11 com 30 dias de armazenamento (Figura 24), denotando alta prevalência de *Listeria monocytogenes* no produto analisado. A maior quantidade de amostras positivas foi observada com a marca SDe 1 no tempo (zero), no entanto todas as marcas apresentaram pelo menos uma amostra positiva no dia da aquisição e com 30 dias de armazenamento a 5°C. Aparentemente, o armazenamento por 30 dias a temperatura de refrigeração não contribuiu para o aumento no número de amostras detectadas positivas.

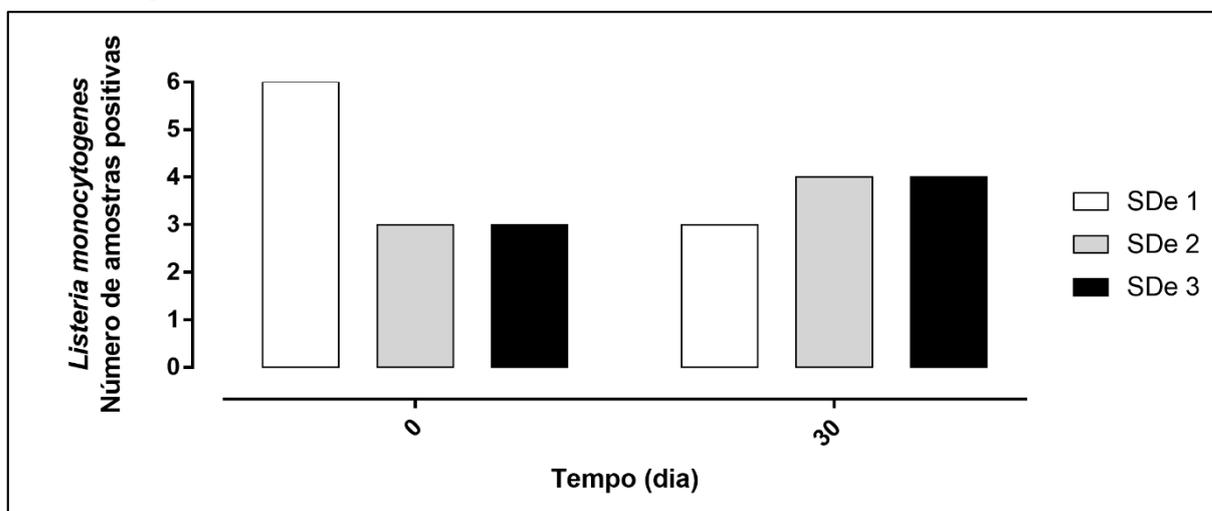


Figura 24. Presença de *Listeria monocytogenes* detectado por qPCR em diferentes marcas de salmão defumado e fatiado no momento da aquisição (tempo zero) e ao longo do armazenamento refrigerado a 5°C por 30 dias.

O salmão defumado a frio é um alimento que apresenta alto risco de contaminação por *L. monocytogenes*, por vários fatores, principalmente durante o processo de obtenção da defumação, como também a temperatura de armazenamento inadequada durante o tempo de estocagem, por esses motivos tem sido um alimento muito estudado nos últimos anos. Soma-se a isto o fato de ser alimento pronto para comer e não passar por um aquecimento que garanta a eliminação de microrganismos patógenos que possam estar presentes, podendo comprometer a saúde do consumidor (AYMERICH et al., 2019; KANG et al., 2021; MAHGOUB et al., 2022). As amostras de salmão defumado e fatiado foram adquiridas na zona sul do Rio de Janeiro, e na zona sul do município de Niterói, únicos locais onde foram encontrados. Todas as amostras de salmão defumado e fatiado compradas e analisadas passaram apenas pelo processo de defumação a frio.

É importante ressaltar, que todas as amostras compradas nos supermercados da zona sul tinham armazenamento adequado para os correspondentes produtos, era uma área específica para produtos de pescado, armazenados em freezer fechado com temperatura de aproximadamente -18°C. Em nenhuma coleta foi verificado produtos descongelados no início do dia, como observado para o kani-kama, que encontrava-se completamente descongelado, indicando que os supermercados da baixada fluminense, possivelmente, não mantêm a cadeia do frio, ocorre variação de temperatura, o que pode favorecer para o crescimento de microrganismos indesejáveis nos alimentos.

Para garantir a segurança do consumidor a presença da *Listeria monocytogenes* nos produtos de pescado prontos para consumo comercializados no Brasil deveria ter tolerância zero para presença do patógeno no produto que não passará por tratamento adicional de

temperatura antes de ser consumido, assim como no Canadá, que não tolera a presença do mesmo em nenhum produto, seja ele pronto para consumo ou não.

5.6 Contagem de *Listeria sp.* e *Listeria monocytogenes* em salmão defumado e fatiado

As contagens da *Listeria sp.* e *Listeria monocytogenes* em meio de cultura ALOA e com confirmação por PCR e qPCR, respectivamente, podem ser observadas na (Figura 25). Houve presença de *Listeria sp.* e *L. monocytogenes* no tempo (zero) em amostras das três marcas analisadas. A confirmação por PCR para *Listeria sp.* revelou um número, significativamente maior após 30 dias de armazenamento ($P < 0.05$) comprovando que ocorreu crescimento da *Listeria sp.* ao longo do tempo de armazenamento. Entretanto somente as marcas SDe 2 e SDe 3 ultrapassaram a contagem de 10^2 UFC/g (Figura 25-A). Para *Listeria monocytogenes* com confirmação por qPCR nenhuma amostra ultrapassou a contagem de 10^2 estando dentro dos padrões microbiológicos para alimentos que determina o máximo de 100 UFC/g em 25 g do produto alimentício pronto para consumo (BRASIL, 2022). Ademais, não houve diferença significativa nas contagens iniciais e após 30 dias a 5°C (Figura 25-B).

Heir et al., (2022) avaliaram um teste de desafio em salmão defumado frio com teor de sódio reduzido em diferentes tempos 0, 7, 12, 19 e 29, e verificaram que após 6 dias de armazenamento a 4°C a contagem de *L. monocytogenes* foi de 3 log UFC/g, considerado baixo pelos autores. Em 29 dias de armazenamento na mesma temperatura não ultrapassou 6 log UFC/g. Os autores concluíram que o crescimento de *L. monocytogenes* em salmão defumado a frio era geralmente independente do tipo de sal mineral, mas a importância primordial de manter uma cadeia de frio contínua desde a produção até o armazenamento.

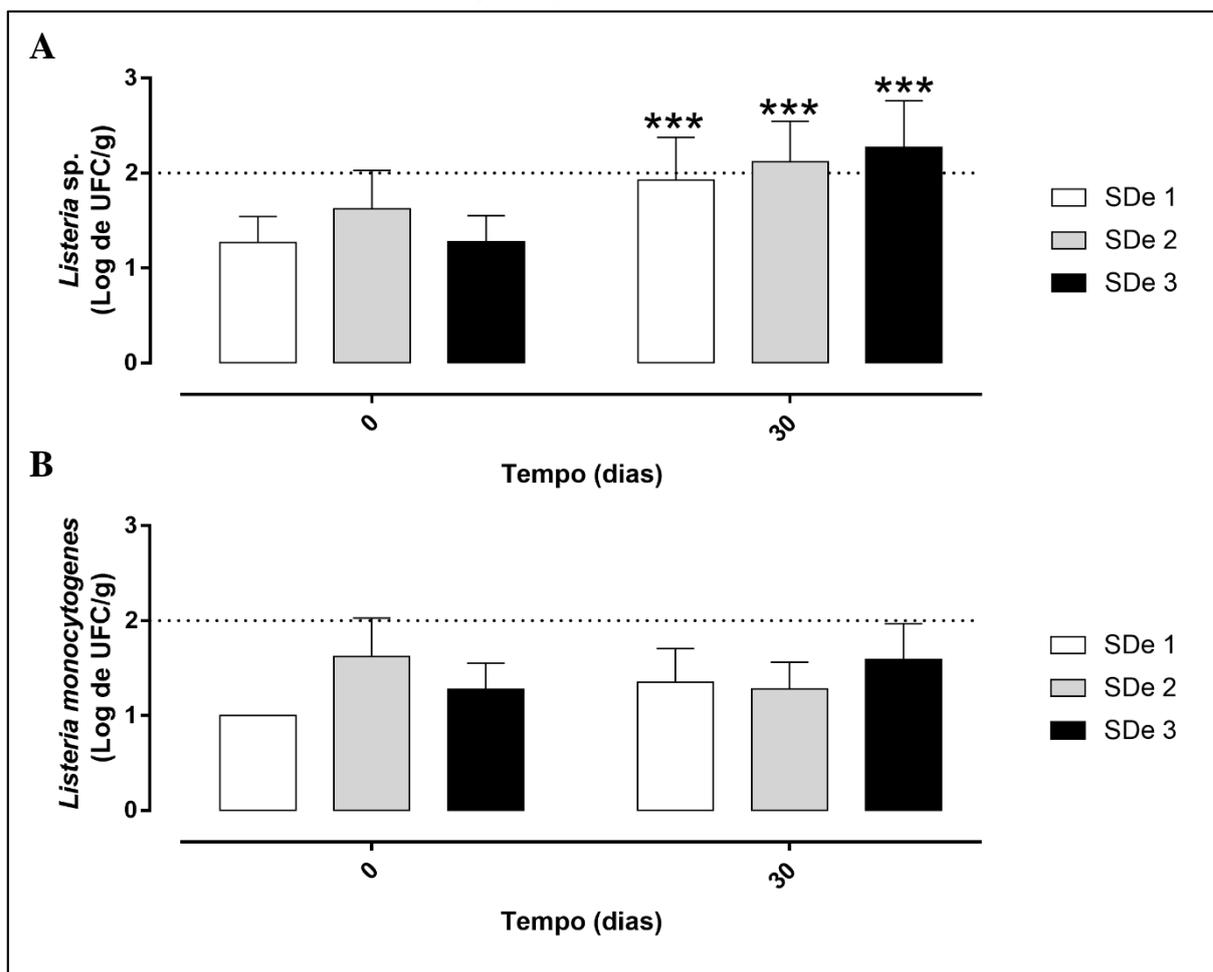


Figura 25. Médias e desvio padrão da contagem da *Listeria* sp. (A) e *Listeria monocytogenes* (B) em salmão defumado e fatiado no dia da aquisição (tempo 0) e após 30 dias armazenado a 5°C. As contagens foram feitas em ágar ALOA e a confirmação por PCR e qPCR. Para fins de cálculo, contagens < 1 Log de UFC/g, foram consideradas 1.

5.7 Contagem de mesófilos aeróbios em kani-kama e salmão defumado e fatiado.

Verificou-se que o número de mesófilos aeróbios em kani-kama, mesmo após 15 dias de armazenamento sob refrigeração de 5°C, não ultrapassou 10⁴ UFC/g (Figura 26-A), não apresentando diferença entre os tempos analisados e provando boas condições higiênicas durante o desenvolvimento do produto. O processo para obtenção do kani-kama é relativamente extenso e requer um controle de qualidade rigoroso, principalmente nas etapas de processamento do surimi, mas o fato do produto ser pasteurizado dentro da embalagem contribui para as baixas contagens. (FUKUDA, 2014)

A contagem de microrganismos mesófilos aeróbios nas amostras de salmão defumado e fatiado é apresentada na (Figura 26-B). Ocorreu diferenças significativas entre os tempos analisados que foram o dia (zero) considerado o dia da aquisição e após 30 dias de armazenamento sob refrigeração a 5°C. A contagem de microrganismos mesófilos aeróbios em nenhuma das amostras ultrapassou 10⁶. Entretanto mesmo assim, foi verificado mudanças sensoriais do salmão defumado como a aparência, odor e textura que estavam muito alterados, sendo perceptível o amolecimento da carne do pescado. Essas características mostram que o salmão defumado a frio continua sendo um produto altamente perecível e que algumas melhorias ainda são necessárias em relação às condições higiênicas durante a produção do produto.

Durante o processo para obtenção da defumação do salmão e fatiamento, alguns equipamentos são utilizados, como os injetores de salga, fatiador e a embaladora a vácuo. Dentre estas etapas mencionadas anteriormente, o fatiamento e o empacotamento a vácuo podem ser considerados dois pontos críticos de controle, pois se ocorrer a contaminação do salmão durante estes estágios será irreversível eliminar microrganismos patógenos que possam estar presente neste produto acabado, por não ser aplicado um tratamento adicional de temperatura em nenhuma etapa do processo (AALTO-ARANEDA et al., 2019). *L. monocytogenes* é sensível a temperatura, entretanto o produto final não passará pela etapa de pasteurização que consiga eliminar microrganismos que possam ter contaminado o produto acabado durante processo, sendo assim, requer um controle de qualidade bastante rigoroso durante todo o processo, principalmente entre uma etapa e outra (MARTINS; LEAL GERMANO, 2011; ROTARIU et al., 2014).

A presença do patógeno *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo mesmo tratados termicamente aponta falha no processo ou pós-processamento que pode ocorrer por contaminação cruzada através das superfícies de contato direto com os alimentos, equipamentos ou manipuladores de alimentos (CABEDO; PICART I BARROT; TEIXIDÓ I CANELLES, 2008).

A higienização dos equipamentos envolvidos no processamento deve ser realizada com sanitizantes eficientes para minimizar ou eliminar a *L. monocytogenes*, tais como, água oxidante eletrolisada que conseguiu reduzir em 3 log a carga microbiana no salmão cru antes do processo de defumação a frio sem alterar a integridade do pescado como as características sensoriais (GHORBAN SHIROODI et al., 2016), a combinação do lactato de potássio e diacetato de sódio também se mostraram muito eficaz no controle do patógeno citado anteriormente (YOON et al., 2004). A aplicação dos sanitizantes deve ser realizado com frequência, principalmente entre um estágio e outro para evitar qualquer contaminação durante ou após o processo (AALTO-ARANEDA et al., 2019).

Como a *L. monocytogenes* é oportunista e consegue crescer facilmente nas instalações, ralos e paredes do processamento, poderá comprometer a integridade do produto. Ações corretivas com melhor funcionamento do Programa de auto Controle – PAC, uma ferramenta que deveria melhorar significativamente o controle da contaminação com o patógeno (SPANU; JORDAN, 2020). Abaixo, a (Figura 26) apresenta a contagem dos psicrotóxicos totais em kani-kama e salmão defumado e fatiado.

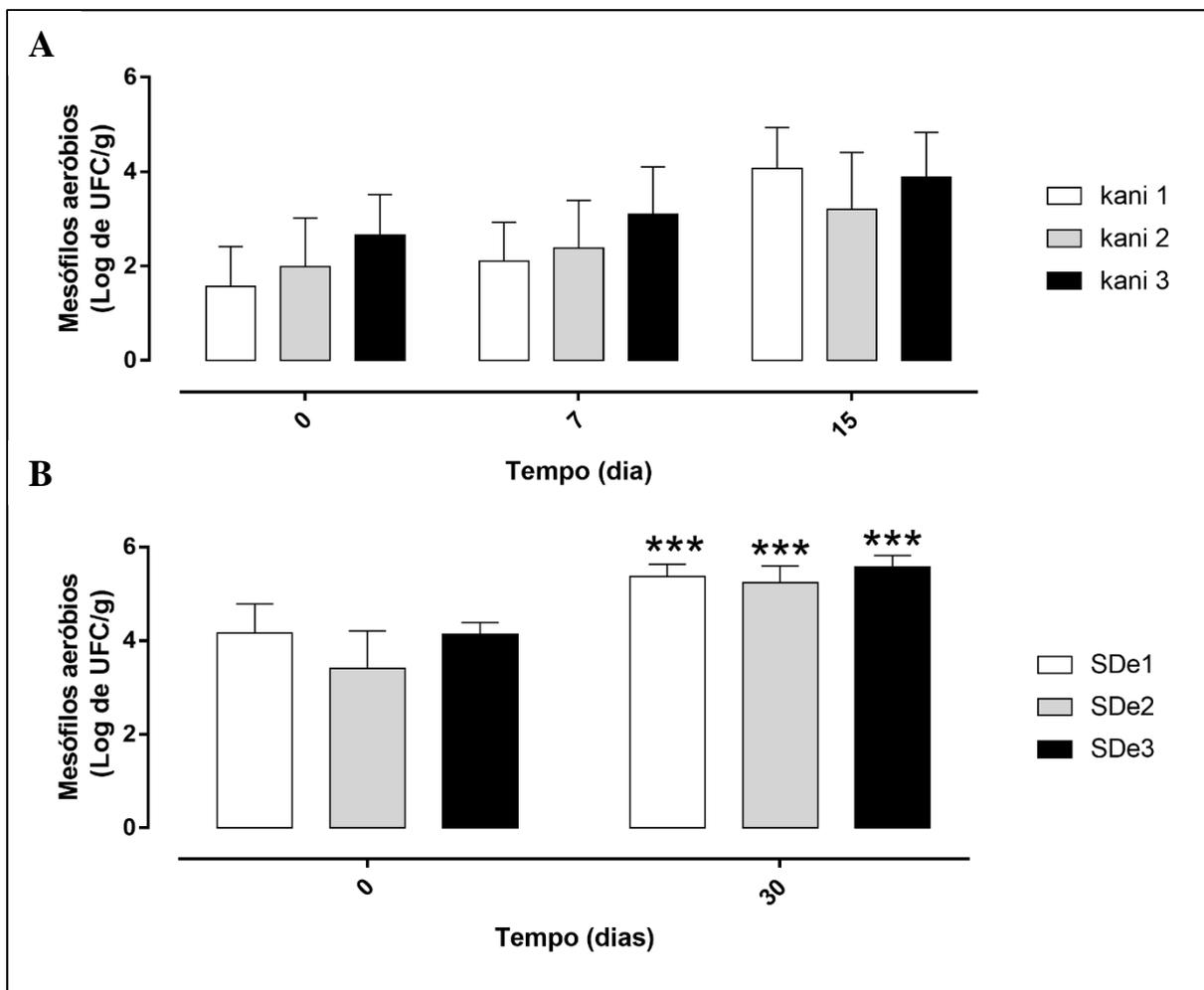


Figura 26. Média e desvio padrão da contagem de mesófilos aeróbios em kani-kama e salmão defumado e fatiado de três marcas comerciais, no momento da aquisição (tempo zero) e ao longo do armazenamento refrigerado a 5°C por 7 e 15 dias para kani-kama (A) e por 30 dias para salmão defumado e fatiado (B).

5.8 Contagem dos psicrotóxicos totais em kani kama e salmão defumado e fatiado.

O presente estudo identificou que a contaminação com microrganismos psicrotóxicos totais nas amostras de kani- kama foi baixa, exceto na marca kani 3 com 15 dias (Figura 27-A) em que ocorreu um crescimento significativo, corroborando com os resultados dos mesófilos aeróbios que ficaram em faixa de contaminação aproximada, entretanto a média das contagens não ultrapassou a contagem de 10^4 UFC/g estando dentro das recomendações para um produto em condições higiênicas satisfatórias.

Nas amostras de salmão defumado e fatiado a população de microrganismos psicrotóxicos das três marcas avaliadas teve maior crescimento quando comparado o tempo (zero) em relação aos 30 dias de armazenamento a 5°C (Figura 27-B). Portanto, todas as amostras com 30 dias sob refrigeração de 5°C, apesar de não ter ultrapassado a contagem de

10⁶ UFC/g, já apresentavam odores desagradáveis, dificultando sentir o aroma característico da defumação.

Os principais microrganismos deteriorantes dos pescados são os aeróbios, como *Pseudomonas*, e anaeróbios facultativos como *Shewanella*. Entretanto quando o peixe é embalado a vácuo, como o kani-kama e salmão defumado a frio, os microrganismos anaeróbios facultativos e anaeróbicos passam a predominar, favorecendo, portanto, o crescimento dos redutores de óxido trimetilamina, como *Shewanella putrefaciens* que também produz H₂S e *Photobacterium phosphoreum*, este último de águas temperadas que é tolerante ao aumento da concentração de CO₂ em produtos embalados em atmosfera modificada. Ambos são psicrotróficos e produzem compostos mal cheirosos reduzindo significativamente a qualidade do pescado e principalmente, reduzindo o tempo de vida útil do produto (GRAM; DALGAARD, 2002; FRANÇOISE, 2010).

Os principais microrganismos da microbiota acompanhante do salmão defumado a frio e embalado a vácuo são *Photobacterium* seguido por *Carnobacterium* (HEIR et al., 2022) bactérias lácticas, *Enterobacteriaceae* e vibrios marinhos (HANSEN; RØNTVED; HUSS, 1998) *Brochothrix* spp. (LEROI et al., 1998). Nesse sentido, segundo Gambarin et al., (2012) que desenvolveu o estudo com produto de pescado prontos para consumo e identificou que a carga de psicrotróficos foi alta nas amostras positivas para *Listeria monocytogenes*. Entretanto, no presente estudo não foi evidenciada qualquer tipo de interação entre a presença de *L. monocytogenes* e a carga de mesófilos ou psicrotróficos, tanto no kani-kama como no salmão defumado.

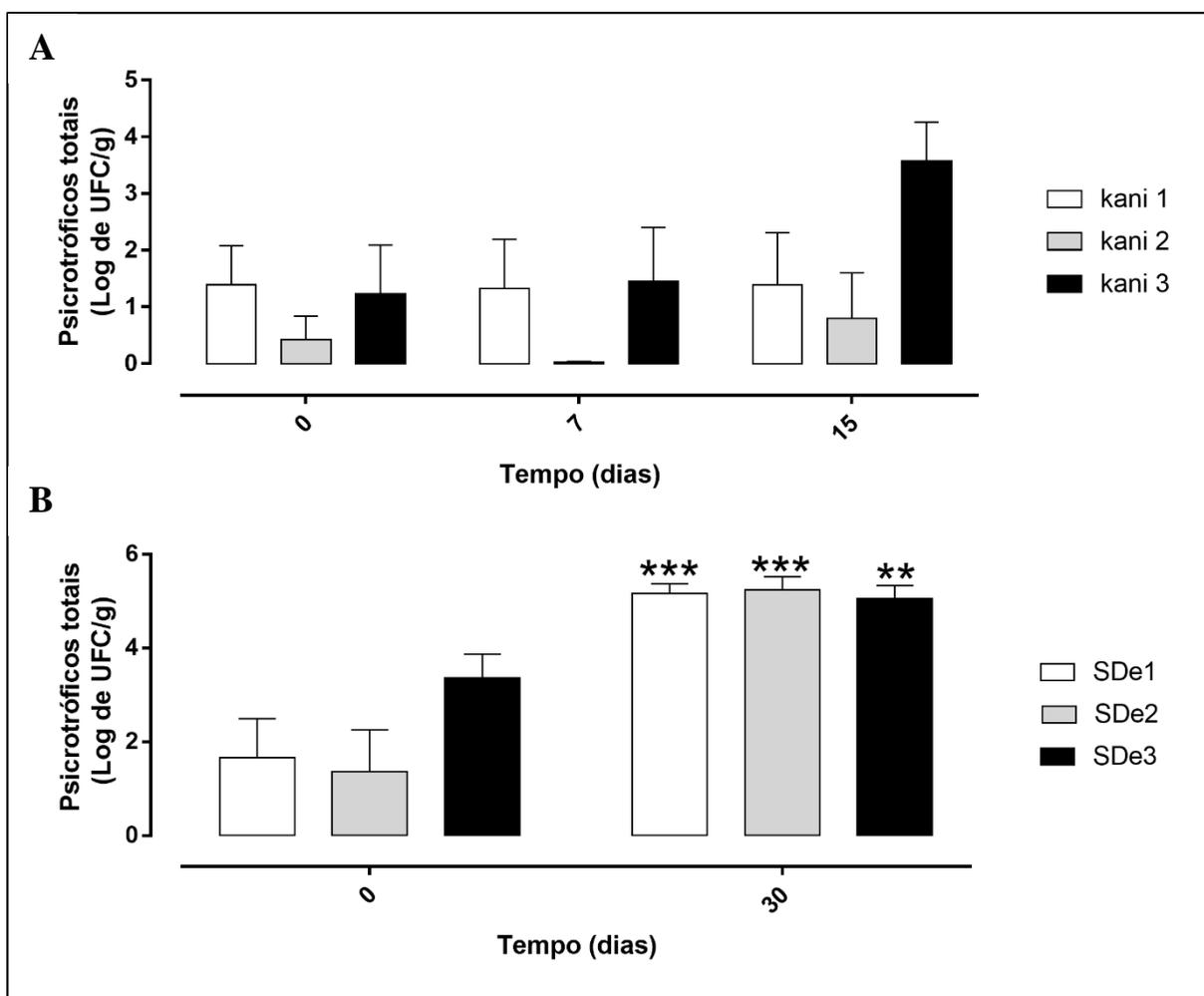


Figura 27. Média e desvio padrão da contagem de psicrotróficos totais em kani-kama e salmão defumado e fatiado de três marcas comerciais, no momento da aquisição (tempo zero) e ao longo do armazenamento refrigerado a 5°C por 7 e 15 dias para kani-kama (A) e por 30 dias para salmão defumado e fatiado (B).

Na (Figura 28) pode-se observar placa com meio de cultura Lyngby específico para detecção de microrganismos produtores de H₂S antes e após a inoculação da amostra de salmão defumado e fatiado com 30 dias de armazenamento sob refrigeração de 5°C, na qual foi evidenciada a capacidade de produção de sulfeto de hidrogênio, e conseqüentemente odores muito fortes, tornando o pescado inviável para consumo. O período de armazenamento e temperatura escolhido para realizar as análises foi simulando a possibilidade do consumidor comprar o produto e armazenar na geladeira sob temperatura de refrigeração.

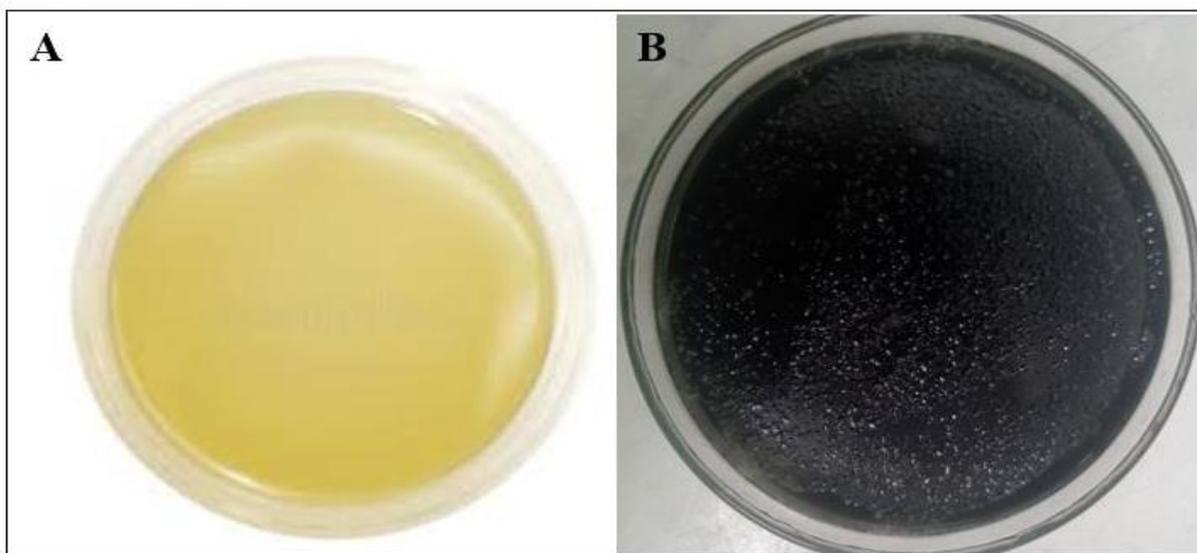


Figura 28. Imagem (A) placa com meio de cultura Lyngby sem inoculação (B) placa inoculada com salmão defumado com 30 dias sob refrigeração a 5°C, apresentando crescimento de microrganismos psicrotróficos produtores de sulfeto de hidrogênio, causadores do escurecimento do meio de cultura.

No estudo realizado por Cardinal et al. (2004) com salmão defumado a frio, identificou-se que 21% dos 57 produtos de salmão defumado a frio avaliados apresentavam alto teor de trimetilamina, produto da redução do óxido de trimetilamina, após duas semanas de armazenamento a 4°C corroborando com os odores desagradáveis observados nos alimentos. Esses autores também destacam que o peixe pronto para consumo continua sendo um produto altamente perecível e que ainda são necessárias melhorias em relação às condições higiênicas durante o processamento do produto.

5.9 Contagem de bactérias lácticas em kani-kama e salmão defumado e fatiado

O crescimento de bactérias lácticas em kani-kama foi muito baixo mesmo após armazenamento a 5°C. Ademais, o maior número de bactérias lácticas foi detectado no tempo zero da marca kani 3 (Figura 29-A), comprovando que o tempo de armazenamento não interferiu no desenvolvimento das bactérias lácticas. A contaminação de bactérias lácticas no kani-kama foi muito baixa, mesmo quando a amostra continha alta contaminação microbiana como os mesófilos, psicrotróficos, *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*. Desta forma, não foi possível identificar interações entre estes grupos de microbianos e, aparentemente, não tiveram participação na atividade deteriorante deste produto. É esperada interação do tipo competitiva

entre bactérias lácticas e *Listeria*, mas no presente estudo as bactérias lácticas estavam presentes em números muito baixos e não foram capazes de crescer sob refrigeração.

No caso do salmão defumado e fatiado as bactérias lácticas apresentaram crescimento significativo ($P < 0.001$) aos 30 dias de armazenamento em relação ao dia da aquisição (Figura 29-B) mas nenhuma das amostras ultrapassou 10^3 UFC/g. Também não foi possível estabelecer uma correlação entre o crescimento de bactérias lácticas e *Listeria monocytogenes*. Esse aumento nas contagens de bactérias lácticas durante o armazenamento refrigerado não foi observado com kani-kama, indicando que, principalmente por causa da etapa de pasteurização que os bastonetes de kani-kama são submetidos dentro da própria embalagem a vácuo elimina grande parte desta microbiota. No caso do salmão defumado que não passa por nenhum tratamento adicional de temperatura, todo cuidado na higienização de todo processo é necessário (ROTARIU et al., 2014).

Nos últimos anos, vários estudos com bactérias lácticas tem sido desenvolvido com a finalidade de bioconservação dos produtos de pescado, principalmente os prontos para consumo, mostrando-se um método de conservação natural muito promissor, que consiste em inocular microrganismos selecionados em produtos alimentícios, principalmente bactérias lácticas se mostraram muito eficientes com potencial de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, como a *L. monocytogenes*, podendo também aumentar a vida útil do produto. São, portanto, indicadas para bioconservação por apresentarem propriedades antibacterianas naturais, inclusive quando fazem parte da microbiota natural dos alimentos prontos para consumo (LEROI et al., 2015; AYMERICH et al., 2019; BOLÍVAR et al., 2021).

No estudo desenvolvido por Rorvik; Yndestad; Skjerve, (1991) e Leroi et al., (1996) com salmão defumado a frio quando refrigerado a 4°C embalado a vácuo verificaram tempo de vida útil de 3 a 5 semanas, com relação aos critérios sensoriais, portanto, uma durabilidade de 28 dias a 5°C tendo como principais microrganismos da microbiota acompanhante uma mistura de culturas entre as bactérias lácticas e bactérias Gram negativas. Nesse sentido, no presente estudo não foi possível comprovar que a carga de bactéria láctica desenvolve uma espécie de competição microbiana contra *L. monocytogenes*.

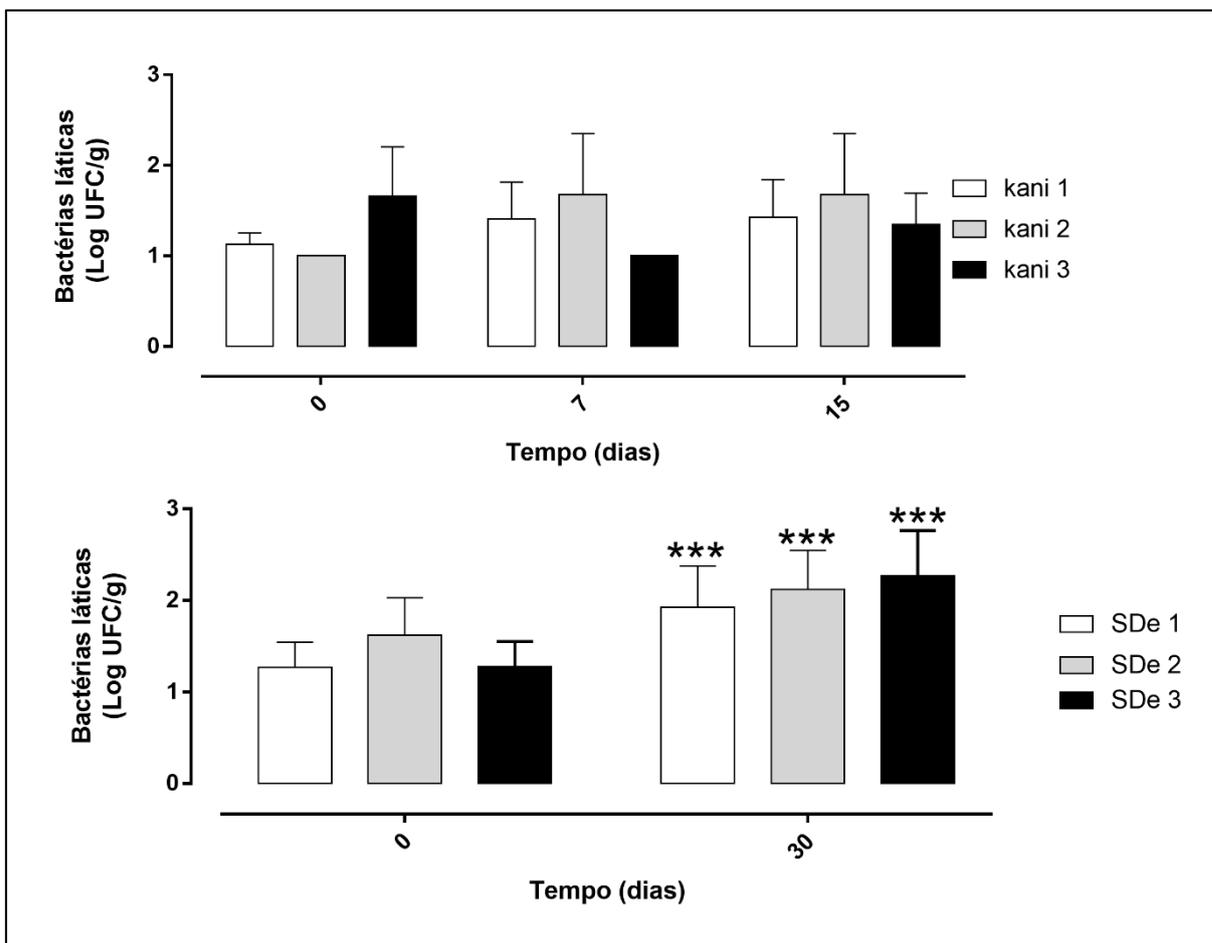


Figura 29. Média e desvio padrão da contagem de bactérias lácticas em kani-kama e salmão defumado e fatiado de três marcas comerciais, no momento da aquisição (tempo zero) e ao longo do armazenamento refrigerado a 5°C por 7 e 15 dias para kani-kama (A) e com 30 dias para salmão defumado e fatiado (B).

5.10 pH das amostras de kani-kama e salmão defumado e fatiado ao longo do tempo de armazenamento.

Foram observadas diferenças entre os tempos analisados, sendo que a marca kani 2 no tempo (zero) que foi considerado dia da aquisição, apresentou um pH aproximado de 6.3, quando armazenado durante 7 dias sob 5°C foi verificado um leve aumento, e quando analisado com 15 dias ocorreu redução. Na marca kani 1 apresentou redução do pH durante os tempos analisados sendo 6.7 no dia da aquisição com redução para aproximadamente 6.1 com 15 dias de armazenamento. No caso do kani 3 o pH no tempo zero de 6.9 reduziu para 6.5 com 7 dias e aumentou com 15 dias de armazenamento para 6.9 novamente (Figura 30-A).

Quanto ao pH do salmão defumado e fatiado as amostras foram analisadas no dia (zero), considerado (zero) dia da aquisição e 30 dias de armazenamento em 5°C. No primeiro dia as amostras apresentaram diferenças muito pequenas entre as marcas, cujo pH inicial de aproximadamente 6.5 para todas as marcas. Houve redução do pH com 30 dias de armazenamento, passando a 6.2 nas amostras das marcas SD1 e SD3 (Figura 30-B), o que indica que provavelmente a deterioração ainda não era devida a acumulação de compostos básicos.

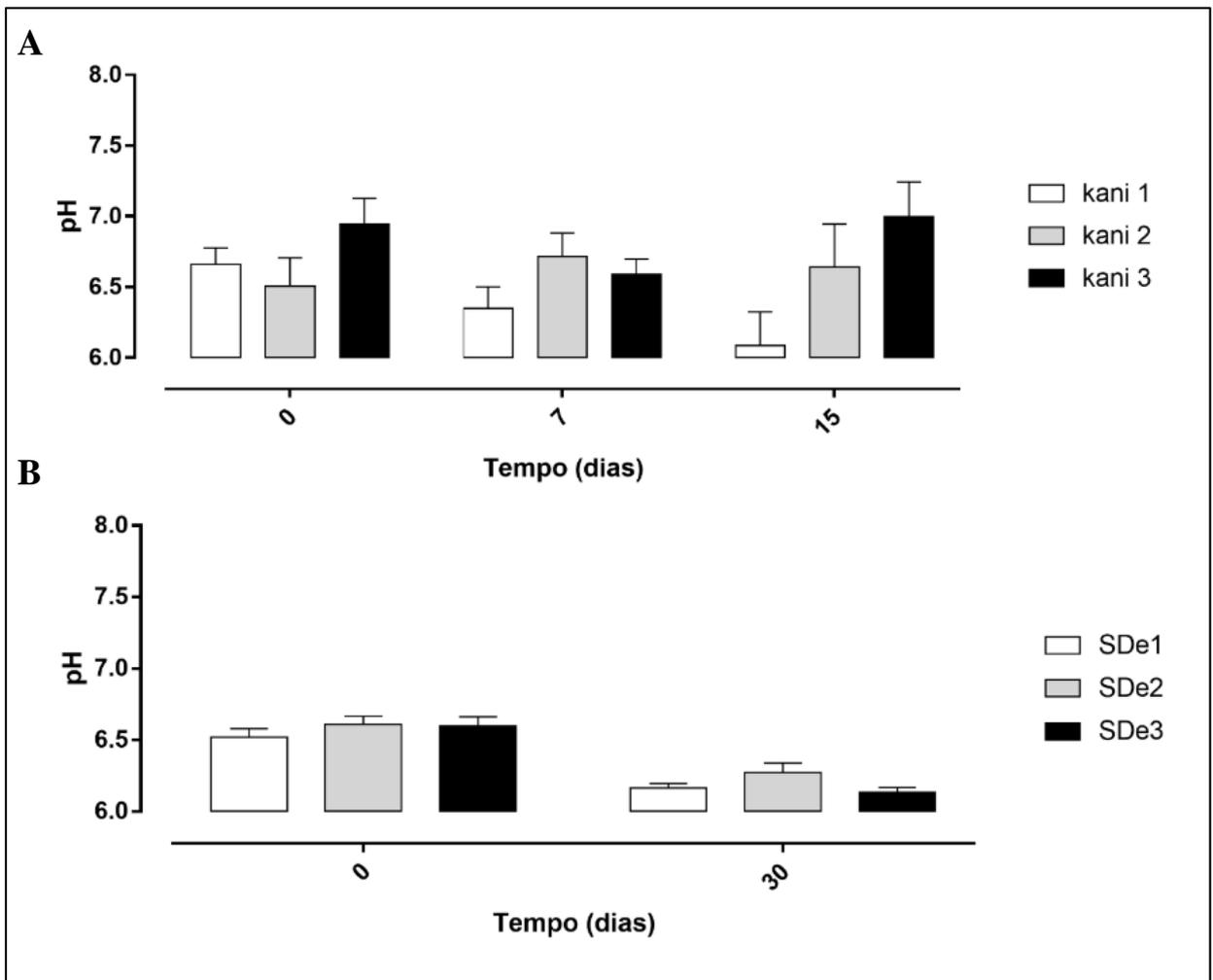


Figura 30. Médias de pH do kani-kama e salmão defumado e fatiado de três marcas comerciais, diferentes, no momento da aquisição (tempo zero) e ao longo do armazenamento refrigerado a 5°C por 7 e 15 dias para kani-kama (A) e com 30 dias para salmão defumado e fatiado (B).

No estudo realizado por Aymerich et al., 2019 com salmão defumado obteve pH semelhante em todas as três marcas estudadas, sendo 6.03, 6.07 e 6.10 respectivamente após 21 dias de armazenamento a 8°C, esses resultados corrobora com o atual estudo que encontrou valores de pH muito aproximado, e em nenhuma amostra obteve pH < 6.0.

O parâmetro pH deve está dentro das normas estabelecidas para alimentos, principalmente os pescados prontos para consumo com pH $\geq 5,0$ que tem condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos patógeno, como a *Listeria monocytogenes*, sendo necessário para garanti a segurança e manutenção da qualidade dos produtos (BRASIL, 2022).

6. CONCLUSÕES

Kani-kama apesar de ser pasteurizado já embalado, apresentou uma alta ocorrência de *Listeria* sp. e *L. monocytogenes*. Existe a possibilidade do binômio tempo temperatura não ser adequado para eliminação de *Listeria* ou a utilização de matérias primas altamente contaminadas. Obviamente que nesses casos a manutenção em temperaturas de refrigeração ao invés do congelamento poderá ainda propiciar a multiplicação daqueles microrganismos sobreviventes, já que algumas amostras foram encontradas descongeladas nos supermercados.

Apesar da presença de *Listeria monocytogenes* no kani-kama e salmão defumado nenhuma amostra ultrapassou a contagem de 2 log UFC/g, limite máximo para presença do patógeno em alimentos prontos para consumo no Brasil.

Observou-se maior número de amostras positivas durante o armazenamento refrigerado comparadas ao tempo zero, indicando que a refrigeração por tempo longo pode representar um risco adicional a sanidade, mesmo para produtos ultra processados como o kani-kama.

Com relação a microbiota acompanhante detectou-se população maior de mesófilos aeróbios e de psicotróficos totais no salmão defumado, que apesar de não ultrapassar 6 log UFC/g, já se encontrava sensorialmente alterado após 30 dias de armazenamento refrigerado.

O número de bactérias lácticas detectados nas amostras de salmão defumado e fatiado foi de cerca de 2 Log UFC/g, ainda muito baixo para exercer algum tipo de interação com *L. monocytogenes*

A presença de *Listeria* sp. nas amostras de kani-kama e salmão defumado é um indicativo da possibilidade de desenvolvimento de *L. monocytogenes* já que ambas as populações apresentam condições ecológicas semelhantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR ISO 11290-1**: Microbiologia da cadeia produtiva de alimentos — Método horizontal para a detecção e enumeração de *Listeria monocytogenes* e de *Listeria* spp. Parte 1: Método de detecção. Brasil: ABNT, 2020. 38p.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR ISO 11290-2**: Microbiologia da cadeia produtiva de alimentos — Método horizontal para a detecção e enumeração de *Listeria monocytogenes* e de *Listeria* spp. Parte 2 Método de enumeração. Brasil: ABNT, 2020. 33p.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 4833-1:2015** Microbiologia da cadeia produtiva de alimentos – Método horizontal para a enumeração de microrganismos: Parte: 2 Contagem de colônias a 30°C pela técnica de plaqueamento em superfície. Brasil: ABNT, 2015. 13p.

AALTO-ARANEDA, M. et al. Processing plant and machinery sanitation and hygiene practices associate with *Listeria monocytogenes* occurrence in ready-to-eat fish products. **Food Microbiology**, v. 82, n. September 2018, p. 455–464, 2019.

ALFARO, A. et al. Parâmetros de processamento e aceitabilidade de apresuntado elaborado com surimi de pescada- foguete(Macrodon Ancylodon). **Brazilian Journal of Food Nutrition**, v. 15, p. 259–265, 2004.

ANGELIDIS, A. S.; KALAMAKI, M. S.; GEORGIADOU, S. S. Identification of non-*Listeria* spp. bacterial isolates yielding a β -d-glucosidase-positive phenotype on Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti (ALOA). **International Journal of Food Microbiology**, v. 193, p. 114–129, 2015.

ARAUJO, R. et al. Metodologias sensoriais com consumidores em uma abordagem prática: salmão congelado como exemplo. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 1, p. 215–236, 2020.

ARCHER; D. L. The Evolution of FDA’s Policy on *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods in the United States. **COFS**, 2018.

ARSLAN, S.; ÖZDEMİR, F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese. **Food Control**, v. 19, n. 4, p. 360–363, 2008.

AYMERICH, M. T. et al. Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: Characterization of bacteriocins. **Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 33–45, 2000.

AYMERICH, T. et al. Assessment of the bioprotective potential of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 8 °C. **Food Microbiology**, v. 83, n. April, p. 64–70, 2019.

BAKA, M. et al. Critical assessment of the time-to-detection method for accurate estimation of microbial growth parameters. **Journal of Food Safety ISSN**, p. 14, 2014.

BARBOSA, J.; TEIXEIRA, P. Analysis of Alternative Shelf Life-Extending Protocols and. 2022.

BEHS, G. **Efeito do processamento na composição centesimal e na análise sensorial de salmão selvagem e de cativoiro.** 2011.63p. **Trabalho de conclusão de curso** (Graduação em nutrição) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BIERNE, H. et al. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1156–1166, 2007.

BIJI, K. B. et al. Biogenic amines in seafood: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 5, p. 2210–2218, 2016.

BOLÍVAR, A. et al. A new expanded modelling approach for investigating the bioprotective capacity of *Latilactobacillus sakei* CTC494 against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat fish products. **Food Research International**, v. 147, 2021.

BOULARES, M. et al. Characterisation, identification and technological properties of psychotrophic lactic acid bacteria jfs_385 333..344 originating from tunisian fresh fish. **Journal of Food Safety**, v. 32, p. 333–344, 2012.

BOULARES, M. et al. Anti-Listerial inhibitory lactic acid bacteria in fresh farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets during storage at 4 °C under vacuum-packed conditions. **Journal of Food Safety**, v. 37, n. 3, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997, regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe fresco (inteiro e eviscerado). Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1997.

BRILLET, A. et al. Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 1029–1037, 2004.

BRILLET, A. et al. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 309–324, 2005.

BUCHANAN;ROBERT et al. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Science Direct**, v. 75, p. 1–13, 2017.

BUCHRIESER, C. et al. Complete genome sequence of the animal pathogen *Listeria ivanovii*, which provides insights into host specificities and evolution of the genus *Listeria*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 23, p. 6787–6788, 2011.

CABEDO, L.; PICART I BARROT, L.; TEIXIDÓ I CANELLES, A. Prevalence of *Listeria*

monocytogenes and Salmonella in ready-to-eat food in Catalonia, Spain. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 4, p. 855–859, 2008.

CALO-MATA, P. et al. Current Applications and Future Trends of Lactic Acid Bacteria and their Bacteriocins for the Biopreservation of Aquatic Food Products. **Food Bioprocess Technol**, v. 1, p. 43–63, 2008.

CAMPO-DEAÑO, L.; TOVAR, C. The effect of egg albumen on the viscoelasticity of crab sticks made from Alaska Pollock and Pacific Whiting surimi. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1641–1646, 2009.

CARVALHO, F.; SOUSA, S.; CABANES, D. How *Listeria monocytogenes* organizes its surface for virulence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. APR, p. 1–22, 2014.

CDC. Listeriosis.

CHAILLOU, S. et al. Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. **International Society for Microbial Ecology**, p. 1–14, 2014.

CHEN, J. et al. Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. **Food Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 103–111, 2009.

CHEN, R. et al. Pre-growth conditions and strain diversity affect nisin treatment efficacy against *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 333, n. July, p. 108793, 2020.

CORDEIRO, K. S. Micro-organismos indicadores e patogênicos, susceptibilidade à antimicrobianos e histamina em sashimi de salmão (*Salmo salar*). 2017.

CRUZ, C. D. et al. Epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 375–383, abr. 2008.

CULVER, C., ET AL. Coloring Technology for surimi Seafood. **American Chemical Society**, 2008.

DEVER, F.; SCHAFFNER, D.; SLADE, P. Methods for the detection of foodborne listerla monocytogenes in the u.s. **Journal of Food Safety**, v. 13, p. 263–292, 1993.

DIOP, M. et al. Les produits de la mer au Sénégal et le potentiel des bactéries lactiques et des bactériocines pour la conservation. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.**, v. 14, p. 341–350, 2010.

EC. Commission regulation (EC) No 1441/2007. **Official Journal of the European Union**, v. 322, n. 1441, p. 2–29, 2007.

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority), and e. (European m. a. ecdc/efsa/ema second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals: Joint Interagency Antimicrobial

Consumption and Resistan. **EFSA Journal**, v. 15, n. 7, 2017.

EFSA, E. F. S. A. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU EFSA. **Journal published by John Wiley and Sons Ltd on behalf of European Food Safety Authority**, 2018.

ESSID, I.; MEDINI, M.; HASSOUNA, M. Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. **Meat Science**, v. 81, p. 203–208, 2009.

EUMOFA. **Eu consumer habits regarding fishery and aquaculture products - annex 1 mapping and analysis of existing studies on consumer habits** European Market Observatory for fisheries and aquaculture products. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/a4aa6860-6256-11e7-b2f2-01aa75ed71a1/language-en/format-PDF>>.

FAO; WHO. **Food control system assessment tool: Introduction and glossary. Food safety and quality series No. 7/1**. [s.l: s.n.].

FARBER, . . M.; PETERKIN, . . I. *Listeria monocytogenes* , a **Food-Borne Pathogen**. v. 55, n. 3, p. 476–511, 1991.

FARBER, J. M. et al. A small outbreak of listeriosis potentially linked to the consumption of imitation crab meat. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 100–104, 2000.

FDA. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. **Fish and Fishery Products Hazard and Control Guidance Fourth Edition**, n. April, p. 1–401, 2011.

FDA. **Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins**. Second ed. [s.l.] Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) - FDA, 2012.

FOGAÇA, F. et al. Caracterização de surimi obtido a partir da carne mecanicamente separada de tilápia do Nilo e elaboração de fishburger. **Ciência de Alimentos**, v. 36, p. 765–776, 2015a.

FOGAÇA, F. H. et al. Restructured products from tilapia industry byproducts: The effects of tapioca starch and washing cycles. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, n. July, p. 482–488, 2015b.

FRANÇOISE, L. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 698–709, 2010.

FUKUDA, Y. Processing technology for walleye pollock: Surimi innovation. **Fisheries Science**, v. 80, n. 2, p. 205–211, 2014.

GAMBARIN, P. et al. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood and potential Hazards for the consumers. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

GHORBAN SHIROODI, S. et al. Efficacy of electrolyzed oxidizing water as a pretreatment method for reducing *Listeria monocytogenes* contamination in cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Food Control**, v. 60, p. 401–407, 2016.

GIMENEZ, B.; DALGAARD, P. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 96–109, 2004.

GONÇALVES, E. et al. Padronização de uma PCR para a autenticação do *Salmo salar* em pratos da culinária japonesa. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 71, p. 640–646, 2019.

GONZÁLEZ, D. et al. *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood in Spain: Study of prevalence and temperatures at retail. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 374–378, 2013.

GRAM, L.; DALGAARD, P. Fish spoilage bacteria - Problems and solutions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 262–266, 2002.

GUSTAVSSON, J.; CEDERBERG, C.; SONESSON, U. **Global food losses and food waste Food and Agriculture Organization of the United Nations**. [s.l: s.n.].

HANSEN, L. T.; RØNTVED, S. D.; HUSS, H. H. Microbiological quality and shelf life of cold-smoked salmon from three different processing plants. **Food Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 137–150, 1998.

HEIR, E. et al. Organic Acid Salts. **Foods**, v. 11, 2022.

HOEL, S.; VADSTEIN, O.; JAKOBSEN, A. The Significance of Mesophilic Aeromonas spp. in Minimally Processed Ready-to-Eat Seafood. **Microorganisms**, v. 7, p. 25, 2019.

HWANHLEM, N. et al. Application of a nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L isolated from brackish water for biopreservation in cooked, peeled and ionized tropical shrimps during storage at 8 °C under modified atmosphere packaging. **Eur Food Res Technol**, 2015.

IBRAHIM, F.; VESTERLUND, S. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as protective culture in vacuum-packed raw salmon (*Salmo salar*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, p. 22, 2013.

ILSI. Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis - A risk-based approach. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 9, p. 1932–1994, 2005.

ISEPPI, R. et al. Characterization of Anti-*Listeria monocytogenes* Properties of two Bacteriocin-Producing *Enterococcus mundtii* Isolated from Fresh Fish and Seafood. **Current Microbiology**, v. 76, n. 9, p. 1010–1019, 2019a.

ISEPPI, R. et al. Characterization of Anti-*Listeria monocytogenes* Properties of two Bacteriocin-Producing *Enterococcus mundtii* Isolated from Fresh Fish and Seafood. **Current Microbiology**, n. 76, p. 1010–1019, 2019b.

JENSEN, N. E. et al. *Listeria monocytogenes* in bovine mastitis. Possible implication for human health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 32, n. 1–2, p. 209–216, 1996.

JEYALETCHUMI, P. et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods 1Jeyaletchumi,.

International Food Research Journal, v. 17, p. 1–11, 2010.

JOFFRAUD, J.-J. et al. Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 51–61, 2006.

JOFFRAUD, J. J. et al. Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 175–184, 2001.

KANG, J. et al. Dynamic model to describe kinetic behavior of *Listeria monocytogenes* in smoked salmon. **Journal of Food Safety**, v. 41, n. 5, p. 1–6, 2021.

KINOSHITA H. et al. Lactic acid bacterial exopolysaccharides strongly bind histamine and can potentially be used to remove histamine contamination in food. **Microbiology**, v. 167, n. 1, 2021

KNOPE, K.; SLOAN-GARDNER, T. S.; STAFFORD, R. J. Histamine fish poisoning in Australia, 2001 to 2013. **Communicable diseases intelligence quarterly report**, v. 38, n. 4, p. E285–E293, 2014.

LAHIRI, D. et al. Bacteriocin: A natural approach for food safety and food security. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, n. October, p. 1–19, 2022.

LEE, Y. C. et al. Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 4, p. 836–844, 2015.

LEROI, F. et al. Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf-life of vacuum-packed cold smoked salmon. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, n. 6, p. 497–504, 1996.

LEROI, F. et al. Study of microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, n. 1–2, p. 111–121, 1998.

LEROI, F. et al. Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 578–587, 2001.

LEROI, F. Bactéries lactiques et applications alimentaires. Partie 2 : les produits de la mer. **Physiologie, Métabolisme, Génomiques et Applications Industrielles des bactéries lactiques**, p. 459–474, 2009.

LEROI, F. et al. Selection of bioprotective cultures for preventing cold-smoked salmon spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 213, p. 79–87, 2015.

LOMONACO, S.; NUCERA, D.; FILIPELLO, V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. **Infection, Genetics and Evolution**, 2015.

LUNDÉN, J. **Persistent *Listeria monocytogenes* contamination in food processing plants**. . 2017.60 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, University of Helsinki, Finland, 2017.

MAHGOUB, S. A. et al. Identification of Non-Listeria and Presence of *Listeria* in Processing Line Production of Cold-smoked Salmon. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 65, n. 7, p. 241–250, 2022.

MARTIN-SANCHEZ, A. et al. Alternatives for Efficient and Sustainable Production of Surimi: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p. 359–374, 2009.

MARTINS, E. A.; LEAL GERMANO, P. M. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 297–302, 2011.

MATLE, I.; MBATHA, K. R.; MADOROBA, E. A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 87, n. 1, p. 1–20, 2020.

MAZZOTTA, A. S. Thermal inactivation of stationary-phase and salt-adapted *Listeria monocytogenes* during postprocess pasteurization of surimi-based imitation crab meat. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 4, p. 483–485, 2001.

MEDINA, J. R.; GARROTE, R. L. The effect of two cryoprotectant mixtures on frozen surubí surimi. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p. 419–424, 2002.

MINOZZO, M. *Processamento e Conservação do Pescado*. 2011.

MIYASAKI, K. et al. High prevalence, low counts and uncommon serotypes of *Listeria monocytogenes* in linguça, a Brazilian fresh pork sausage. **Meat Science**, p. 523–527, 2009.

MORGANO, M. et al. As, Cd, Cr, Pb and Hg in seafood species used for sashimi and evaluation of dietary exposure. **Food Control**, v. 36, p. 24–29, 2014.

NÚÑEZ-MONTERO, K. et al. *Listeria costaricensis* sp. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 844–850, 2018.

OF, T. H. E. S. **In Brief to The State of World Fisheries and Aquaculture 2022**. [s.l.: s.n.].

PILET, M.; LEROI, F. Applications of protective cultures, bacteriocins and bacteriophages in fresh seafood and seafood products. **Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation**, p. 324–347, 2011.

PRESENZA, L. **Desenvolvimento de Fishburger utilizando salmão do atlântico (salmo salar - linnaeus, 1758): Caracterização microbiológica, físico-química e sensorial**. 2019. 63 p. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia de pesca) Instituto Federal do Espírito Santo, Piuma.

RAENGPRADUB, S.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Comparative analysis of the σ^B -dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 158–171, 2008.

RANTSIOU, K. et al. Expression of virulence genes of *Listeria monocytogenes* in food. **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 2, p. 161–168, 2012.

REIS, F. B. et al. Use of *Carnobacterium maltaromaticum* cultures and hydroalcoholic extract of *Lippia sidoides* Cham. against *Listeria monocytogenes* in fish model systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 3, p. 228–234, 2011.

REN, S. et al. Bacteriocin from *Lacticaseibacillus rhamnosus* sp. A5: Isolation, Purification, Characterization, and Antibacterial Evaluation for Sustainable Food Processing. **Sustainability (Switzerland)**, v. 14, n. 15, 2022.

RIPPEN, T. .; HACKNEY, C. . Seafood pasteurization: potencial for shelf life extension and control of pathogenes. **Food Technology**, v. 46, n. 0015–6639, p. 88–90, 1992.

RØRVIK, L. M.; YNDESTAD, M.; SKJERVE, E. Growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, smoked salmon, during storage at 4° C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 111–117, 1991.

ROTARIU, O. et al. Smoked salmon industry practices and their association with *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 284–292, 2014.

SALES, P.; SALES, V.; OLIVEIRA, E. Avaliação sensorial de duas formulações de hambúrguer de peixe. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, p. 17–23, 2015.

SARAOUI, T. et al. Improving simultaneously the quality and safety of cooked and peeled shrimp using a cocktail of bioprotective lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 2016a.

SARAOUI, T. et al. *Lactococcus piscium*: a psychrotrophic lactic acid bacterium with bioprotective or spoilage activity in food—a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, p. 907–918, 2016b.

SHARMA, H. et al. Recent development in the preservation effect of lactic acid bacteria and essential oils on chicken and seafood products. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. December, p. 1–17, 2022.

SHIN, J. H.; KANG, D. H.; RASCO, B. Effect of different packaging methods and storage temperatures on the growth of *Listeria monocytogenes* in raw and hot smoked rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 17, n. 2, p. 137–155, 2008.

SILVA, M. **Avaliação microbiológica e de indicadores sensoriais de aparas de salmão-do-atlântico (*Salmo salar* - Linnaeus, 1758)**. 2011. 42 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária e Zootecnia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J.; KLEIBERG, G. Effect of Modified Atmosphere Packaging and Superchilled Storage on the Microbial and Sensory Quality of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fillets. **Journal of Food Science** ·, v. 68, p. 1467–1472, 2003.

SOMJID, P. et al. Reduced washing cycle for sustainable mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) surimi production: Evaluation of bio-physico-chemical, rheological, and gel-forming properties. **Foods**, v. 10, n. 11, 2021.

SOUZA, A. L. M. DE et al. Histamina e rastreamento de pescado: revisão de literatura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, n. 0, p. 1–11, 2016.

SOUZA, J. et al. Peixe Defumado. **Embrapa Informação Tecnológica(Agroindústria Familiar)**, p. 37, 2007.

SPANU, C.; JORDAN, K. *Listeria monocytogenes* environmental sampling program in ready-to-eat processing facilities: A practical approach. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 2843–2861, 2020.

STAMATIS, N.; ARKOUELOS, J. Quality assessment of *Scomber colias japonicus* under modified atmosphere and vacuum packaging. **Food Control**, v. 18, n. 4, p. 292–300, 2007.

STESSL, B. et al. Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 651–659, 2009.

STOHR, V. et al. Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. **Food Research International** 34, v. 34, p. 797–806, 2001.

STUPAR, J. et al. Diversity and antimicrobial activity towards listeria spp. And escherichia coli among lactic acid bacteria isolated from ready-to-eat seafood. **Foods**, v. 10, n. 2, 2021.

SVEINSDOTTIR, K. et al. Application of Quality Index Method (QIM) scheme in shelf-life study of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal of Food Science**, v. 67, n. 4, p. 1570–1579, 2002.

TABANELLI G. et al. Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacteria using bacteriocin forming lactococci. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.190, 14 23, 2014

TAHIRI, I. T. et al. Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked wild salmon. **Food Microbiology journal**, v. 26, p. 783–793, 2009.

TODOROV, S. et al. Caracterização de uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei* R1333 isolada de salmão defumado. **Anaeróbio**, v. 17, p. 23–31, 2011.

VALØ, T.; JAKOBSEN, A. N.; LERFALL, J. The use of atomized purified condensed smoke (PCS) in cold-smoke processing of Atlantic salmon - Effects on quality and microbiological stability of a lightly salted product. **Food Control**, v. 112, n. December 2019, p. 107155, 2020.

VÁZQUEZ, J. A. et al. The Objectives of the Business Intelligence Project | InetSoft Webinar. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584–640, 2001.

WAN NORHANA, M. N. et al. Prevalence, persistence and control of Salmonella and *Listeria*

in shrimp and shrimp products: A review. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 343–361, 2010.

YOON, K. S. et al. Control of growth and survival of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon by combined potassium lactate and sodium diacetate and freezing stress during refrigeration and frozen storage. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 11, p. 2465–2471, 2004.