

Influência do meio de cultura na determinação da resistência térmica de *Listeria monocytogenes* em formulações para hambúrguer

Influence of the plating medium in the determination of thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in formulations for hamburger.

RIALA6/1161

Maria Helena Castro Reis PASSOS¹, Arnaldo Yoshiteru KUAYE^{1*}

* Endereço para correspondência: Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, nº 80 Campinas, SP/Brasil, Caixa postal 6121 CEP.13083-862 fone: (19) 3521 4097, fax (19) 3289-3517, email: kuaye@fea.unicamp.br

¹ Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos/ FEA/UNICAMP, Campinas, SP/ Brasil

Recebido: 01/04/2008 – Aceito para publicação: 15/08/2008

RESUMO

A influência do meio de cultura na recuperação da população sobrevivente sobre os valores *D* para *L. monocytogenes* foi avaliada em formulações de hambúrguer bovino: 10% de gordura (F1), 20% de gordura (F2), 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio (F3) e 10% de gordura e 10,5% de proteína de soja texturizada hidratada (F4), inoculadas com suspensão mista de 5 cepas de *L. monocytogenes*. Empregando-se ágar triptose fosfato + 1% de piruvato de sódio (ATFP) os valores *D* (min) variaram de 36,11 (F1) a 62,76 (F3) a 55,0°C, de 2,55 (F2) a 4,32 (F3) a 60,0°C e de 0,34 (F1 e F2) a 0,52 (F3) a 65,0°C. Os valores *D* calculados utilizando-se ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LFM) variaram de 23,05 (F1) a 38,54 (F3) a 55,0°C; 1,81 (F2) a 3,06 (F3) a 60,0°C e de 0,25 (F2) a 0,37 (F3) a 65,0°C. Os valores *z* (°C) variaram de 4,81 (F3) a 4,95 (F4) com ATFP e 5,08 (F2) a 5,21 (F4) com LFM. Os autores concluíram que a resistência térmica de *L. monocytogenes* em formulações para hambúrguer bovino foi subestimada até 1,6-1,7 vezes quando o meio LFM foi utilizado.

Palavras-chave. *Listeria monocytogenes*, hambúrguer, resistência térmica, meio de cultura.

ABSTRACT

The influence of the plating medium used for the recovery of survivors, on the *D*-values for *L. monocytogenes*, in formulations for beef hamburger was investigated: 10% fat (F1), 20% fat (F2), 10% fat and 1.5% sodium chloride (F3) and 10% fat and 10.5% hydrated texturized soy protein (F4) were prepared and inoculated with a mixture of five strains of *L. monocytogenes*. Using tryptose phosphate agar containing 1% sodium pyruvate (TPAP) *D*-values (min) ranged from 36.11 (F1) to 62.76 (F3) at 55.0°C, from 2.55 (F2) to 4.32 (F3) at 60.0°C and from 0.34 (F1 e F2) to 0.52 (F3) at 65.0°C. The *D*-values, using lithium chloride phenylethanol moxalactam medium (LPM) for enumeration, ranged from 23.05 (F1) to 38.54 (F3) at 55.0°C; from 1.81 (F2) to 3.06 (F3) at 60.0°C and from 0.25 (F2) to 0.37 (F3) at 65.0°C. The *z*-values (°C), using the TPAP recovery data, ranged from 4.81 (F3) to 4.95 (F4) and from 4.95 (F3) to 5.21 (F4) using the LPM recovery data. The authors concluded that the heat resistance of *L. monocytogenes* in formulations for beef hamburger can be underestimated when LPM is used as the recovery medium.

Key words. *Listeria monocytogenes*, hamburger, heat resistance, culture medium.

INTRODUÇÃO

Os meios de cultura normalmente utilizados para detecção e contagem de *Listeria* spp. contêm antimicrobianos e vários agentes seletivos que visam inibir o crescimento de outros microrganismos presentes no alimento. Entretanto, tem-se demonstrado que nenhum dos agentes seletivos possui especificidade, podendo inibir o crescimento da própria bactéria que se deseja detectar. Esta inibição é mais evidente quando o

microrganismo é submetido a algum tipo de injúria, como a promovida pelo calor¹.

Quando se submete *Listeria monocytogenes* a condições adversas de natureza física ou química em níveis subletais, as células podem ser injuriadas estrutural e fisiologicamente, resultando, inclusive, em aumento da sensibilidade aos agentes inibidores presentes no meio, o que impede sua recuperação e subsequente crescimento. Entretanto, quando inoculadas em meios não seletivos, nutricionalmente ricos, as células injuriadas

podem se recuperar e crescer, tornando possível sua detecção e quantificação^{1,2,3}.

O ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LFM) é um dos meios de cultura mais utilizados e é considerado bastante eficiente para a detecção e contagem de *L. monocytogenes* em alimentos, inclusive produtos cárneos^{4,5}. Entretanto, sua composição não permite o crescimento de células injuriadas pelo calor⁴.

Em trabalhos realizados para determinar a resistência térmica de *L. monocytogenes* em meio de cultura, pode ser observada a utilização de meios não seletivos para contagem dos sobreviventes^{6,7,8}. Entretanto, tem sido demonstrado que esta bactéria é mais resistente ao calor em carne do que em meio de cultura, o que é atribuído a diferenças na composição do substrato de aquecimento^{3,9}. Além disso, o aquecimento em caldo não reproduz a verdadeira condição existente no tratamento térmico do alimento.

Em estudos de determinação da resistência térmica de *L. monocytogenes* em carne bovina moída, pesquisadores têm submetido a carne a um tratamento térmico preliminar para reduzir a microbiota contaminante, possibilitando, assim, a recuperação das células em meios sólidos não seletivos^{9,10,11,12}.

Este trabalho objetivou avaliar a influência do meio de cultura empregado na contagem da população sobrevivente na resistência térmica de *L. monocytogenes* em formulações para hambúrguer bovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo dos ingredientes: carne

Peças de acém (corte dianteiro de bovino), adquiridas no comércio de Campinas-SP, foram imersas em água fervente por 2 minutos. A camada externa foi removida assepticamente e descartada. As porções de carne com maior quantidade de tecido adiposo foram separadas das porções magras e moídas separadamente, para serem utilizadas no ajuste do teor de gordura das formulações. A trituração da carne foi realizada com moedor (Electrolux) provido de disco com furos de 4 mm de diâmetro. As partes removíveis do moedor foram esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 min. Após a retirada de amostras para determinação dos teores de umidade e gordura, contagem de bactérias aeróbias mesófilas e detecção e contagem de *L. monocytogenes*, as porções de carne moída, acondicionadas em sacos plásticos, foram armazenadas a -18°C. O procedimento utilizado no preparo da carne foi similar ao descrito por Schoeniet al.¹².

Preparo dos ingredientes: proteína de soja texturizada (PST)

A PST foi armazenada em recipiente estéril hermético, após remoção de amostra para contagem de bactérias aeróbias mesófilas e detecção e contagem de *L. monocytogenes*.

Preparo das formulações para hambúrguer

Após descongelamento a 4°C/24h, as porções de carne foram homogeneizadas em ambiente asséptico, preparando-se quatro formulações: carne com 10% de gordura (F1), carne com 20% de gordura (F2), carne com 10% de gordura e 1,5% de NaCl (F3) e carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína de soja texturizada hidratada (F4). Antes de adicionada à carne, a PST foi hidratada na proporção de 2:1 (água:PST), por imersão em água estéril a 60°C/20 min.

Após mistura dos ingredientes e trituração das formulações, efetuou-se a remoção de amostras para determinação do pH, atividade de água (Aa), composição centesimal e contagem de bactérias aeróbias mesófilas. As formulações de hambúrguer (100g) foram, então, acondicionadas em sacos plásticos estéreis e armazenadas a -18°C.

Avaliação físico-química e bacteriológica dos ingredientes e das formulações

Análises físico-químicas

Para a determinação de umidade, proteínas e cinzas foram utilizados os métodos descritos, respectivamente, nas seções 24.002, 24.027 e 24.009 da ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC)¹³, e para a gordura empregou-se o método de Bligh e Dyer¹⁴. A determinação do pH seguiu a metodologia descrita por Sebranek¹⁵ (1978 apud Schoeni et. al., 1991)¹², empregando-se potenciômetro (B374, Micronal) previamente calibrado. A Aa foi avaliada utilizando-se higrômetro elétrico (AquaLab, Decagon).

Análises bacteriológicas

Contagem de bactérias aeróbias mesófilas: foi realizada utilizando-se a técnica de inoculação em profundidade com o meio ágar padrão para contagem (APC, Oxoid), incubação a 35°C/48h, conforme recomendado por Morton¹⁶.

Detecção e contagem de *L. monocytogenes*: As amostras foram analisadas através de contagem direta em placas e através de enriquecimento seletivo.

Porções de 25 g de amostra foram homogeneizadas em homogeneizador de pistões (mod.400, Stomacher), com 225 ml de caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB, Oxoid), sem acriflavina, durante 2 min. Alíquotas de 1 ml (subdivididas em 0,3 + 0,3 + 0,3 + 0,1 ml) foram inoculadas superficialmente em placas contendo ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LFM, Difco)¹⁵, com incubação a 30°C/48h. A contagem de colônias típicas de *Listeria* (coloração azulada com aparência de vidro moído) foi realizada com o auxílio da iluminação a 45°, empregando-se iluminador (KL1500, Schott), espelho côncavo e microscópio estereoscópico (4752, Karl Zeiss) conforme Ryser e Donnelly¹⁷.

A presença de *L. monocytogenes* foi avaliada através de enriquecimento seletivo, após adição de acriflavina (Sigma) e homogeneização durante 2 min, seguiu-se a metodologia recomendada por Warburton et al.¹⁸, utilizando-se LFM (Difco) e ágar Oxford (Oxoid) modificado (MOX) para plaqueamento.

Determinação do tempo “Lag” de aquecimento

O tempo “lag” de aquecimento foi determinado a 55,0; 60,0 e 65,0°C. Dois gramas de carne foram acondicionados em tubos de destruição térmica (TDT) ($\phi_{\text{externo}}=8\text{mm}$ e comprimento=105 mm) e inseriu-se um termopar de cobre-constantan (tipo T) (TT T-36, Omega Engineering, Inc.), de forma que a junta de medida ficasse no centro geométrico da amostra. Em seguida, o tubo foi imerso em banho de gelo. Quando a temperatura da carne atingiu 5-6°C, o tubo foi transferido para um banho termostático (H-12105-10, Cole Parmer, precisão de $\pm 0,25^\circ\text{C}$) contendo água e ajustado à temperatura desejada, acionando-se no mesmo instante o cronômetro. Quando a carne atingiu a temperatura do banho, registrou-se o tempo marcado pelo cronômetro (tempo “lag” de aquecimento). A temperatura da amostra durante o aquecimento foi monitorada através do termopar conectado a um registrador de temperatura (H-92800-10, Cole Parmer), previamente programado para registrar a temperatura a cada intervalo de 5 s. Este procedimento foi repetido 10 vezes para cada temperatura, por tipo de formulação. Os instrumentos de medida de temperatura foram aferidos com termômetros de bulbo de mercúrio (ASTM-USA), calibrados com padrões “National Institute of Standards and Technology” (NIST).

Preparo do inóculo

Foi utilizada como inóculo uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes* (*L.m.*): Scott A (sorovar 4b) e quatro cepas isoladas de carne bovina moída *L.m.* 259 (4b), *L.m.* 357 (1/2a), *L.m.* 374 (1/2a) e *L.m.* 410 (1/2a). Todas as cepas, avaliadas conforme recomendado por Lovett e Hitchins¹⁹, apresentaram patogenicidade positiva em testes com camundongos. As culturas foram mantidas a 4°C em tubos com ágar tripticase soja (Oxoid) inclinado contendo 0,6% de extrato de levedura (Difco) (ATS-EL), foram replicadas mensalmente a fim de manter a viabilidade das células.

As culturas foram ativadas mediante três transferências consecutivas para caldo tripticase soja (Oxoid) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (Difco) (ATS-EL), a fim de se obter células na fase estacionária de crescimento. Após incubação a 35°C durante 15 horas, as suspensões foram centrifugadas (J2-21, Beckman) a 5.500 x g a 4°C durante 15 min e lavadas duas vezes com tampão Butterfield. Em seguida, o sedimento final foi suspenso no mesmo diluente, de forma a se obter uma concentração de cerca de 10^{10} UFC/ml, conforme determinado em experimentos preliminares. Volumes iguais de cada cultura foram então misturados, efetuando-se a contagem através de inoculação superficial em placas contendo ágar triptose fosfato (ATF) (caldo tripton fosfato, Difco; 2% de ágar, Merck) e

incubação a 35°C/48h. A mistura assim preparada foi imediatamente inoculada nas formulações.

Inoculação e acondicionamento das formulações nos tubos TDT

Após descongelamento a 4°C/24h, as porções de 100 g de carne foram inoculadas com a mistura de culturas numa proporção de 1% (v/p), seguindo-se uma homogeneização manual e, depois, em homogeneizador de pistões, durante 1 min. Em ambiente asséptico, e com a carne inoculada mantida em banho de gelo, foi efetuado o acondicionamento de 2 g nos tubos TDT procedendo-se, no final, a uma limpeza cuidadosa da parede interna dos tubos com “swab” estéril. Em seguida, os tubos foram fechados com tampa de borracha e armazenados a 4°C/18 h.

Resultados obtidos em testes preliminares demonstraram que o tempo de armazenamento das amostras até o tratamento térmico, não teve influência na resistência térmica da bactéria.

Tratamento térmico e contagem de *L. monocytogenes*

Os tubos foram imersos em banho termostático (H-12105-10, Cole Parmer, precisão de $\pm 0,25^\circ\text{C}$) ajustado à temperatura de 55,0; 60,0 ou 65,0°C, de forma que o nível da água ficasse 2 cm acima do nível da carne.

Quando a amostra atingiu a temperatura do banho (ao final do tempo “lag” de aquecimento), dois tubos foram imediatamente removidos e resfriados em banho de gelo. A partir desse ponto, dois tubos foram removidos a cada um dos seguintes intervalos de tempo:

55,0°C: 20, 40, 60, 80 e 100 min

60,0°C: 2, 4, 6, 8 e 10 min

65,0°C: 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 min

No ensaio a 55,0°C, para a formulação F3, também foram removidos dois tubos após 120 min. Nos experimentos a 65,0°C, adicionalmente, foram retiradas amostras durante o tempo “lag” de aquecimento (dois tubos após 1,0 e 1,5 min, contados a partir da imersão no banho).

Os experimentos foram replicados duas vezes para cada temperatura, por tipo de formulação.

Após resfriamento em banho de gelo, a carne foi transferida para saco plástico estéril, procedendo-se a lavagem do tubo duas vezes com 1,5 ml de tampão Butterfield. O volume de diluente foi então completado para 18 ml, efetuando-se a homogeneização da amostra durante 2 min em homogeneizador de pistões. Em seguida, foram preparadas diluições sucessivas no mesmo diluente, com inoculação superficial em placas contendo ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio (ATFP) (CTF, Difco; 2% de ágar, Merck, piruvato de sódio, Merck) e em LFM (Difco), seguido de incubação a 35 e 30°C durante 72 h, respectivamente. Todas as colônias típicas, observadas através de iluminação a 45°, foram consideradas unidades de *L. monocytogenes*. O mesmo método foi utilizado para avaliação da carne contida em dois tubos que não sofreram tratamento térmico.

Determinação dos valores *D* e *z*

A duração do tratamento térmico empregado foi corrigida para considerar o efeito do tempo “lag”, calculando-se o tempo de aquecimento equivalente à temperatura de referência (temperatura do banho). Nos experimentos realizados a 65,0°C, os intervalos de tempo decorrentes da remoção de amostras durante o tempo “lag” também foram considerados para o cálculo do tempo de aquecimento à temperatura de referência.

Utilizando-se os dados de temperatura registrados durante o tempo “lag” de aquecimento foi possível calcular as taxas letais, empregando-se a fórmula do método geral²⁰:

$$L=10^{(T-T_R)/z}$$

onde *L* é a taxa letal, *T* é a temperatura da amostra durante o aquecimento (°C), *T_R* é a temperatura de referência (temperatura do banho) (°C) e os valores *z* iniciais considerados foram 5,25°C e 5,72°C, para os dados obtidos, respectivamente, em ATFP e LFM [médias dos valores obtidos através de regressão linear das curvas “fantasma” de destruição térmica ($\log_{10} D \times$ temperatura), considerando-se a contagem obtida no tempo “lag” como contagem no tempo “zero” de aquecimento]. O tempo de aquecimento à temperatura do banho foi então calculado empregando-se o método de Patashnik²¹.

Esses tempos corrigidos foram usados na determinação dos valores *D*, obtidos por regressão linear das curvas de sobrevivência (\log_{10} do número de sobreviventes \times tempo de aquecimento). As curvas “fantasma” de destruição térmica ($\log_{10} D \times$ temperatura) foram então traçadas, obtendo-se os valores *z* através de regressão linear. Como a taxa letal é função do valor *z*, todo o cálculo foi repetido até que os valores *z* calculados e os valores *z* iniciais fossem rigorosamente iguais.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), complementando-se a análise com o teste de Duncan para comparação de médias. Em todos os testes foi

considerado um nível de 5% de significância. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa STATISTICA 5.0 (StatSoft, Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação bacteriológica dos ingredientes

A contagem obtida para bactérias aeróbias mesófilas foi de $3,00 \times 10^3$ e $6,10 \times 10^4$ UFC/g para as porções de carne com baixo e alto teor de gordura, respectivamente. Para a PST, obteve-se uma contagem de $2,58 \times 10^2$ UFC/g. Na análise para detecção e contagem de *L. monocytogenes* nos ingredientes não foi observada nenhuma colônia típica.

Avaliação físico-química e bacteriológica das formulações

Na Tabela 1, pode-se observar que a adição de PST à carne (F4) resultou em pequeno aumento do valor de pH, enquanto a adição de NaCl (F3) promoveu redução da *A_a*. Além disso, pode ser verificado que os teores de lipídeos estão próximos aos teores pré-definidos.

A contagem de bactérias aeróbias mesófilas nas formulações foi de $1,05 \times 10^4$; $9,50 \times 10^3$; $3,40 \times 10^4$ e $1,90 \times 10^4$ UFC/g para F1, F2, F3 e F4, respectivamente, indicando que a manipulação e o processo de trituração das formulações não contribuiu para o aumento da contaminação, considerando-se as contagens iniciais do principal ingrediente, a carne.

Determinação dos valores *D* e *z*

A técnica utilizada para redução da contaminação da carne fresca permitiu que a população de *L. monocytogenes* inoculada superasse a população dos contaminantes em pelo menos três ciclos logarítmicos, e possibilitou a contagem da bactéria em ATFP, meio não seletivo que promove a recuperação de células injuriadas pelo calor, sem comprometer os resultados.

Tabela 1. Características físico-químicas das formulações de hambúrguer^a.

Parâmetros	Formulações ^b			
	F1	F2	F3	F4
pH	5,72	5,72	5,69	5,89
<i>A_a</i>	0,990	0,990	0,981	0,990
Umidade (%)	70,71	62,13	68,90	69,54
Proteínas (%)	18,50	16,96	19,08	19,38
Lipídeos (%)	10,38	20,46	10,49	9,77
Cinzas (%)	0,89	0,84	2,22	1,04

^a: valor médio de 3 amostras

^b: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína de soja texturizada hidratada

Observa-se, na Tabela 2, que os valores das contagens obtidas para *L. monocytogenes* nas amostras que não sofreram tratamento térmico não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$) entre os dois meios de cultura (ATFP e LFM) na contagem do inóculo inicial.

No trabalho de Fain et al.²² também foi observado que não havia diferença significativa na contagem de *L. monocytogenes* nas amostras de carne que não sofreram aquecimento, quando comparou-se LFM e ágar Columbia contendo 1% de piruvato de sódio.

Buchanan et al.⁴ demonstraram que o LFM, assim como outros meios seletivos utilizados para *Listeria*, promove uma recuperação quantitativa equivalente à do ATFP, quando consideradas células não injuriadas pelo calor.

Na Tabela 3 observa-se que os valores *D* obtidos para *L. monocytogenes* a partir da contagem dos sobreviventes em ATFP foram maiores do que em LFM em todas as temperaturas testadas, independente da formulação. A análise de regressão linear empregada para avaliação das curvas de sobrevivência resultaram em valores R^2 superiores a 0,94 e 0,92, quando foram

Tabela 2. Contagem de *L. monocytogenes* nas formulações de hambúrguer que não sofreram tratamento térmico.

Temperatura ^a (°C)	Repl. ^b	Log ₁₀ UFC/g ^c									
		F1 ^d		F2		F3		F4			
		ATFP ^e	LFM ^e	ATFP	LFM	ATFP	LFM	ATFP	LFM		
55,0	1	7,74	7,75	7,74	7,84	7,85	7,81	7,88	7,95		
	2	7,70	7,71	7,65	7,63	7,84	7,85	7,96	7,93		
60,0	1	7,49	7,59	7,59	7,63	7,53	7,55	7,88	7,87		
	2	7,77	7,84	7,67	7,69	7,74	7,66	8,07	8,12		
65,0	1	7,71	7,75	7,77	7,75	7,75	7,81	8,00	7,98		
	2	7,89	7,86	7,72	7,75	7,78	7,84	8,02	7,97		

^a: temperatura do tratamento térmico subsequente

^b: replicatas 1 e 2

^c: valor médio de 2 amostras. Para cada formulação, não existe diferença significativa ($P>0,05$) entre os valores médios na mesma linha

^d: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína de soja texturizada hidratada

^e: ATFP: ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio

LFM: ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam

Tabela 3. Valores *D* e *z* para *L. monocytogenes*, inoculada em formulações de hambúrguer, obtidos a partir da contagem dos sobreviventes em ATFP e LFM.

Temperatura (°C)	Meios ^a	Valor <i>D</i> (min) ^b			
		F1 ^c	F2	F3	F4
55,0	ATFP	36,11 (0,74) ^{dA}	39,93 (0,56) ^A	62,76 (1,46) ^A	37,97 (1,33) ^A
	LFM	23,05 (0,15) ^B	23,46 (0,74) ^B	38,54 (0,52) ^B	23,93 (0,32) ^B
60,0	ATFP	2,86 (0,13) ^A	2,55 (0,19) ^A	4,32 (0,08) ^A	3,24 (0,05) ^A
	LFM	2,09 (0,23) ^A	1,81 (0,12) ^A	3,06 (0,01) ^B	2,02 (0,04) ^B
65,0	ATFP	0,34 (0,01) ^A	0,34 (0,01) ^A	0,52 (0,01) ^A	0,36 (0,01) ^A
	LFM	0,27 (0,00) ^A	0,25 (0,00) ^A	0,37 (0,01) ^A	0,29 (0,01) ^A
valor <i>z</i>	ATFP	4,93°C	4,83°C	4,81°C	4,95°C
	LFM	5,18°C	5,08°C	4,95°C	5,21°C

^a: ATFP: ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio

LFM: ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam

^b: valor médio de 2 repetições

^c: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína de soja texturizada hidratada

^d: desvio padrão entre parênteses

^{A, B}: para cada temperatura de aquecimento, valores na mesma coluna seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ($P<0,05$)

considerados os dados obtidos, respectivamente, em ATFP e LFM.

Smith e Archer²³ (1988, apud Buchanan et al.⁴) e Bush e Donnelly²⁴ demonstraram que a adição de piruvato de sódio ao meio de cultura não seletivo aumentava a recuperação de *L. monocytogenes* injuriada pelo calor. No entanto, para outros autores^{3,4}, a presença de substâncias inibidoras no LFM, assim como em outros meios utilizados para detecção e contagem de *Listeria* sp., impede a recuperação e subsequente formação de colônias por células submetidas a este tipo de estresse.

Assim sendo, os valores *D* mais elevados obtidos neste trabalho são atribuídos à ausência de agentes seletivos no meio ATFP, e à sua capacidade de aumentar a recuperação das células injuriadas pelo calor, o que resultou na quantificação de um maior número de células viáveis.

Schoeni et al.¹² e Fain et al.²², avaliando a resistência térmica de *L. monocytogenes* em carne bovina moída, também verificaram que a utilização de meios não seletivos, adicionados ou não de piruvato de sódio, resultou na obtenção de valores *D* superiores aos encontrados com LFM. Resultado similar foi obtido por Harrison e Huang²⁵ em carne de caranguejo, comparando os meios ágar tripticase soja e Vogel-Johnson modificado.

Outros autores^{7,8,26,27,28} também mostraram a influência do meio utilizado para contagem dos sobreviventes no valor *D* para *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* O157:H7 e *Yersinia enterocolitica* submetidas a aquecimento em meio de cultura e carne bovina moída.

Analisando-se os dados na Tabela 3, pode ser observado que o efeito do meio de plaqueamento foi mais evidente a 55,0°C, quando os valores *D* encontrados com ATFP foram 1,6 a 1,7 vezes superiores àqueles obtidos com LFM, e diminuiu com o aumento da temperatura. A 60,0°C os valores *D* determinados com ATFP foram 1,4 a 1,6 vezes mais elevados, enquanto que a 65,0°C não foi observada diferença significativa entre os dois meios ($P < 0,05$).

Fain et al.²² também observaram um maior efeito do meio de cultura nos valores *D* determinados a 51,7 do que a 62,8°C. Os valores *D*_{51,7°C} obtidos com ágar Columbia adicionado de piruvato foram quase duas vezes maiores que os valores encontrados com LFM, enquanto que a 62,8°C este aumento variou entre 1,1 e 1,2 vezes. Resultado similar foi obtido por Clavero et al.²⁶ ao submeter *E. coli* O157:H7 a aquecimento entre 54,4 e 68,3°C.

Segundo Golden et al.⁶ e El-Shenawy et al.²⁹ (1989 apud Ollinger-Snyder et al., 1995)³⁰, uma maior parcela da população de *L. monocytogenes* encontra-se em condição de injúria subletal à temperaturas de aquecimento mais baixas do que à temperaturas mais elevadas. Assim, o efeito mais intenso do meio de plaqueamento a 55,0°C observado neste trabalho, pode estar relacionado com o fato de existir uma maior população injuriada a esta temperatura, o que evidenciou a diferença entre os meios quanto à capacidade de recuperação dos sobreviventes.

Na Tabela 3, observa-se que embora os valores *z* obtidos

com LFM sejam maiores do que com ATFP, a diferença (0,14 a 0,26°C) não é significativa. Nos trabalhos citados na literatura, podem ser observadas diferenças entre valores *z* variando de 0 a 1,41°C, quando comparados meios seletivos e não seletivos.

CONCLUSÕES

O procedimento utilizado para redução da contaminação inicial da carne mostrou ser eficiente, e possibilitou a contagem de *L. monocytogenes* em ATFP, meio de cultura não seletivo que permite a recuperação de células injuriadas pelo calor, sem interferência significativa da microbiota contaminante.

O meio de cultura empregado na contagem da população sobrevivente teve influência nos valores *D* obtidos para *L. monocytogenes* submetida a aquecimento em formulações para hambúrguer, principalmente a 55°C. A esta temperatura, os valores *D* obtidos através da contagem em ATFP foram 1,6-1,7 vezes maiores que os encontrados com LFM, o que demonstra que a resistência térmica da bactéria é subestimada quando LFM é utilizado para contagem dos sobreviventes.

Na prática, o tratamento térmico a 55,0°C, temperatura geralmente utilizada no processo “sous vide”, se forem considerados os valores *D* obtidos através da contagem em LFM, o tempo de processo definido como seguro pode vir a ser estabelecido em valores até 1,6-1,7 vezes menores do que seria necessário para garantir que o produto final seja seguro ao consumidor.

Os autores evidenciaram, através dos resultados obtidos, a grande importância da escolha do meio de cultura para os estudos de resistência térmica de *L. monocytogenes* e, possivelmente, de outra microbiota bacteriana presente no produto analisado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro, ao Dr. Ernesto Hofer, da Fundação Oswaldo Cruz, pela sorotipagem das cepas de *L. monocytogenes*, e à Isabela B. Cardoso pelo auxílio técnico.

REFERÊNCIAS

1. Ryser ET, Marth EH, Editors. *Listeria*, *Listeriosis* and *Food Safety*. 2nd ed., New York: Marcel Dekker, Inc.; 1999, p. 131-224.
2. Mossel DAA. *Listeria monocytogenes* in foods. Isolation, characterization and control. *Int J Food Microbiol*. 1989; 8 (3): 183-95.
3. Warburton DW, Farber JM, Powell C, Tiwari NP, Read S, Plante R, Babiuk T, Laffey P, Kauri T, Mayers P, Champagne MJ, Hunt T, Lacasse P, Viet K, Smando R, Coates F. Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol*. 1992; 9 (2): 127-45.

4. Buchanan RL, Smith JL, Stahl HG, Archer DL. *Listeria* methods development research at the eastern regional research center, U.S. Department of Agriculture. *J Assoc Official Anal Chem*. 1988; 71(3): 651-4.
5. Yu LSL, Fung DY. Evaluation of FDA and USDA procedures for enumerating *Listeria monocytogenes* in ground beef. *Food Microbiol*. 1991; 8 (1): 69-74.
6. Golden DA, Beuchat LR, Brackett RE. Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. *Food Microbiol*. 1988; 5 (1): 17-23.
7. Linton RH, Pierson MD, Bishop JR. Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heat shock. *J Food Prot*. 1990; 53 (11): 924-7.
8. Linton RH, Webster JB, Pierson MD, Bishop JR, Hackney CR. The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Food Prot*. 1992; 55 (2): 84-7.
9. Jorgensen F, Stephens PJ, Knochel S. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol*. 1995; 79 (3): 274-81.
10. Pagán R, Condón S, Sala FJ. Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*. 1997; 63 (8): 3225-32.
11. Quintavalla S, Campanini M. Effect of rising temperature on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat emulsion. *Lett Appl Microbiol*. 1991; 12 (5): 184-7.
12. Schoeni JL, Brunner K, Doyle MP. Rates of thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beef and fermented beaker sausage. *J Food Prot*. 1991; 54 (5): 334-7.
13. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14th ed. 1984. 1141p.
14. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959; 37: 911-7.
15. Sebranek JG. *Meat science and processing*, Paladin House Publishers, Geneva, 1978.
16. Morton RD. Aerobic Plate Count. In: Downes FP, Ito K, editors. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th ed. Washington: Ed APHA; 2001, p.63-8.
17. Ryser ET, Donnelly CW. *Listeria*. In: Downes FP, Ito K, editors. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th ed. Washington: Ed APHA; 2001, p.343-56.
18. Warburton DW, Farber JM, Babiuk T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: Canada Health and Welfare. *Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological analysis of foods*. Polyscience; 1991, v.3[MFHPB 30]
19. Lovett J, Hitchins AD. *Listeria* isolation. In: Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 6th ed. (Suppl) 2nd printing (2/89). Association of Official Analytical Chemists, 1989, Chap. 29, p.29.01-29.14.
20. Stumbo CR. *Thermobacteriology in Food Processing*. 2nd ed. Academic Press; 1973. 329p.
21. Patashnik M. A simplified procedure for thermal process evaluation. *Food Technol*. 1953; 7(1): 1-6.
22. Fain ARJr, Line JE, Moran Ab, Martin LM, Lechowich RV, Carosella JM, Brown WL. Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott A: D-value e z-value determinations in ground beef and turkey. *J Food Prot*. 1991; 54(10): 756-61.
23. Smith JL, DL. Archer. Heat-induced injury in *Listeria monocytogenes*. *J Ind Microbiol*. 1988; 3: 105-10.
24. Busch SV, Donnelly CW. Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Appl Environ Microbiol*. 1992; 58(1): 14-20.
25. Harrison MA, Huang YW. Thermal death times for *Listeria monocytogenes* (Scott A) in crabmeat. *J Food Prot*. 1990; 53 (10): 878-80.
26. Clavero MRS, Beuchat LR, Doyle MP. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from ground beef and bovine feces, and suitability of media for enumeration. *J Food Prot*. 1998; 61 (3): 285-9.
27. Craven SE, Blakenship LC. Increased heat resistance of salmonellae in beef with added soy proteins. *J Food Prot*. 1983; 46 (5): 380-4.
28. Doherty AM, McMahon CMM, Sheridan JJ. Thermal resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in meat and potato substrates. *J Food Safety*. 1998; 18 (2): 69-83.
29. El-Shenawy MA, Yousef AE, Marth EH. Thermal inactivated injury of *Listeria monocytogenes* in reconstituted nonfat dry milk. *Milchwiss*. 1989; 44 (12): 741-5.
30. Ollinger-Snyder P, El-Gazzar F, Matthews ME, Marth EH, Unklesbay N. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in ground pork prepared with and without soy hulls. *J Food Prot*. 1995; 58 (5): 573-6.