

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais

Tássia Estevão Oliveira Furtado

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM *Listeria* spp.
E SUA APLICABILIDADE EM FRANGO DESFIADO**

RIO POMBA/MG

2023

Tássia Estevão Oliveira Furtado

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM *Listeria* spp.
E SUA APLICABILIDADE EM FRANGO DESFIADO**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, *Campus* Rio Pomba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Alimentos.

Orientadora: Profa. Dr^a Wellingta Cristina Almeida do Nascimento Benevenuto

Coorientadores: Prof. Dr. Augusto Aloísio Benevenuto Júnior e Prof. Dr. Maurilio Lopes Martins

RIO POMBA/ MG

2023

Ficha Catalográfica elaborada pela Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais / Campus Rio Pomba
Bibliotecária: Ana Carolina Souza Dutra CRB 6 / 2977

F992a

Furtado, Tássia Estevão Oliveira.

Ação antimicrobiana de nanopartículas de prata em *Listeria spp.* e sua aplicabilidade em frango desfiado./ Tássia Estevão Oliveira Furtado. – Rio Pomba, 2023.

47f.; il.

Orientador: Prof^a Wellingta Cristina Almeida do Nascimento Benevenuto.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba.

1. Segurança microbiológica. 2. Carne processada 3. Patógeno I. Benevenuto, Wellingta Cristina Almeida do Nascimento. II. Título.

CDD: 664.07

Tássia Estevão Oliveira Furtado

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM *Listeria* spp.
E SUA APLICABILIDADE EM FRANGO DESFIADO**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, *Campus* Rio Pomba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovado em 26 de outubro de 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. André N. da Rocha Campos
Doutor em Microbiologia Agrícola
IF Sudeste MG

Prof. Augusto A. Benevenuto Júnior
Doutor em Engenharia Agrícola
IF Sudeste MG

Prof.^a Aurélia D. de O. Martins
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos
IF Sudeste MG

Mariana Silva Coelho
Doutora em Microbiologia Agrícola

Prof.^a Wellingta C. A. do N. Benevenuto
Doutora em Produção Vegetal
IF Sudeste MG

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças, quando as minhas não eram mais suficientes, por ter me carregado no colo e ter me guiado até aqui.

A minha mamãe Sheila Estevão, pelo apoio e incentivo incondicional sempre aos estudos, e ao meu pai José Martim pela dedicação em buscar me proporcionar os meios para realizar meus sonhos, ao meu irmão Thaylor Estevão *in memoriam*, que sempre esteve ao meu lado, desta vez não seria diferente, sinto sempre a sua presença em todas as minhas conquistas e todas minhas batalhas.

Ao Virgílio Furtado que estava presente com nossa pequena Ísis Furtado quando precisei me ausentar, e a ela minha filha Ísis que dividiu o tempo da mamãe com um propósito maior.

Ao Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais e todos os professores, vocês me ensinaram bem mais que conhecimento técnico, trago em mim valores preciosos que me nortearão para sempre.

A minha orientadora Prof^a Wellingta Benevenuto, que foi muito mais que uma orientadora, foi incentivadora, foi acolhimento, obrigada por compartilhar tanto conhecimento e pelo auxílio no decorrer da pesquisa.

Aos coorientadores, Prof. Augusto Benevenuto e Prof. Maurílio Martins, obrigada pela disponibilidade de sempre, pelas sugestões sempre e pelo enriquecimento do trabalho.

A Prof^a Aurélia Martins e Mariana Coelho, e Prof. André meu muito obrigada por aceitarem participar da banca examinadora e pelas sugestões que irão enriquecer o trabalho.

Ao amigo e supervisor Wanderson Valente, que foi o primeiro a acreditar em mim, e me apoiar, minha eterna gratidão.

A empresa onde trabalho, e a gerente Marília Gonçalves pelo incentivo e apoio ao desenvolvimento e crescimento profissional.

A todos meus amigos de turma, em especial os que convivemos mais tempo, Beatriz, Daiana, Flaviane e Luiz Fernando, vocês fizeram essa trajetória leve, e com certeza o aprendizado foi mais rico com os nossos grupos de estudo com muito

companheirismo.

A todos meus amigos e família que lidaram com a minha ausência nesse período, em especial Hingredi, Marcella e Raphaella, obrigada por segurarem minha mão.

“... tudo o que pedirdes em oração, crendo que o recebeste, será vosso.”

Marcos 11-24, A Bíblia Sagrada"

RESUMO

A carne de frango está amplamente disponível no mercado e é uma das mais consumidas no mundo. Cada brasileiro consome cerca de 43 kg de carne de frango por ano, *in natura* e nas mais variadas formas de processamento, o qual visa, além da elaboração de novos produtos, o aumento da vida de prateleira. Entretanto, assim como os produtos crus, os produtos processados também podem ser contaminados, principalmente pós processamento, tornando-se veículos para a disseminação e patógenos como *Listeria* spp.. A utilização de antimicrobianos nas etapas de processamento é uma alternativa, para controlar o desenvolvimento microbiano. A nanotecnologia, em especial as nanopartículas de prata (NPAg), apresentam alto potencial de aplicação na indústria alimentícia. No presente trabalho objetivou-se a utilização de (NPAg) no controle de *Listeria* spp. em frango cozido e desfiado comercializado por uma indústria parceira. Utilizou-se solução de prata coloidal previamente caracterizada nas concentrações de 2, 3, 4, 5, 10 e 20 mg/L, frente a três estirpes de *Listeria* spp. (*L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii*), na técnica de avaliação da sensibilidade onde se avalia o diâmetro da zona de inibição formada ao redor dos discos impregnados com as concentrações, técnica de atividade antimicrobiana, onde se determinou a concentração inibitória mínima em microplacas e a técnica da medida da concentração mínima bactericida, onde foi possível avaliar a inibição por meio de crescimento ou ausência de crescimento. A estirpe mais resistente as soluções de NPAg foi selecionada para a simulação da contaminação pós processamento, sendo inoculada nas amostras de frango desfiado temperado, As amostras de frango desfiado temperado foram mantidas na temperatura de resfriamento (2 a 8°C) por 10 dias. Na avaliação da sensibilidade, todas as três estirpes demonstraram sensibilidade a partir da concentração de 10 mg/L de prata, apresentando halo de inibição superior a 9 mm, sendo *L. innocua* a estirpe que apresentou menor halo no teste. Para a avaliação da atividade antimicrobiana, as três estirpes apresentaram o mesmo resultado, demonstrando sensibilidade a partir de 10mg/L de prata, e mais uma vez *L. innocua* apresentando a maior resistência. Para a medida da concentração mínima bactericida, *L. monocytogenes* demonstrou maior sensibilidade, com inibição a partir de 5 mg/L. A estirpe *L. innocua*, que demonstrou maior resistência nas avaliações anteriores, juntamente com a adição da solução de NPAg, nas concentrações de 10 mg/L de solução de prata coloidal, identificada como a menor concentração inibitória e com a concentração de 6,5 mg/L, concentração um pouco inferior a encontrada, para verificar a efetividade de sua aplicação no produto, foi selecionada para o teste de simulação nas amostras de frango desfiado, como proposta de aumento de *shelf life* e conservação do produto. Contudo as nanopartículas não tiveram ação bactericida frente ao patógeno quando adicionadas diretamente na matriz avaliada.

Palavras-chave: Segurança microbiológica. Carne processada. Patógeno.

ABSTRACT

Application of silver nanoparticles in the control of *Listeria* spp. in shredded Chicken

Chicken meat is widely available on the market and is one of the most consumed in the world. Each Brazilian consumes around 43 kg of chicken meat per year, fresh and in the most varied forms of processing, which aims, in addition to creating new products, increasing shelf life. However, just like raw products, processed products can also be contaminated, mainly post-processing, becoming vehicles for the dissemination of pathogens like *Listeria* spp.. The use of antimicrobials in the processing stages is an alternative, to control microbial growth. Nanotechnology, especially silver nanoparticles (NPAg), have high potential for application in the food industry. This work focused in the use of (NPAg) to control *Listeria* spp. in cooked and shredded chicken sold by a partner industry. A previously selected colloidal silver solution was used at concentrations of 2, 3, 4, 5, 10 e 20 mg/L, against three strains of *Listeria* spp. (*L. monocytogenes*, *L. innocua* and *L. ivanovii*), in the sensitivity assessment technique where the diameter of the inhibition zone formed around the discs impregnated with the concentrations is evaluated, antimicrobial activity technique, where the minimum inhibitory concentration in microplates and the technique for measuring the minimum bactericidal concentration were determined, where it was possible to evaluate inhibition through growth or lack of growth. The strain most resistant to NPAg solutions was selected for the simulation of post-processing contamination, being inoculated in samples of seasoned shredded chicken, the seasoned shredded chicken samples were kept at cooling temperatures (2 to 8°C) for 10 days. In the sensitivity assessment, all three strains demonstrated sensitivity from a concentration of 10 mg/L of silver, presenting a halo of inhibition greater than 9 mm, with *L. innocua* being the strain that presented the lowest halo in the test. For the evaluation of antimicrobial activity, the three strains presented the same result, demonstrating sensitivity from 10mg/L of silver, and once again *L. innocua* showing the greatest resistance. For measuring the minimum bactericidal concentration, *L. monocytogenes* demonstrated greater sensitivity, with inhibition from 5 mg/L. The *L. innocua* strain, which demonstrated greater resistance in previous evaluations, together with the addition of the NPAg solution, at concentrations of 10 mg/L of colloidal silver solution, identified as the lowest inhibitory concentration and with a concentration of 6.5 mg/L, concentration slightly lower than that found, to verify the effectiveness of its application in the product, was selected for the simulation test on shredded chicken samples, as a proposal to increase the shelf life and conservation of the product. However, the nanoparticles did not have bactericidal action against the pathogen when added directly to the evaluated sample.

Keywords: Microbiological Safety; Processed meat; Pathogen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Abate de frangos por regiões no Brasil, em mil toneladas entre 2000 e 2022.....	16
Figura 2 – Mecanismo de ação das NPAG's nas células bacterianas.....	24
Figura 3 – Ativação das estirpes de <i>Listeria</i> spp.....	26
Figura 4 – Soluções utilizadas para determinação da concentração mínima inibitória.....	29
Figura 5 – Esquema da realização do teste de concentração mínima bactericida.....	30
Figura 6 – Percentual de redução de densidade óptica, após 48 horas de incubação.....	35
Figura 7 – Desenvolvimento de <i>L. innocua</i> (UFC/g) previamente inoculada ao longo do armazenamento (2 a 8°C) de frango desfiado.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de infecções bacterianas diagnosticadas em laboratório, hospitalizações, mortes e incidência no ano de 2019 em 10 estados dos Estados Unidos.....	21
Tabela 2 – Caracterização da solução contendo nanopartícula de prata.....	26
Tabela 3 – Preparo das soluções de NPAg em diferentes concentrações.....	27
Tabela 4 – Diâmetro do halo de inibição das soluções contendo diferentes concentrações de NPAg sobre as estirpes de <i>Listeria</i> spp.....	33
Tabela 5 – Diâmetro do halo de inibição sobre as estirpes de <i>Listeria</i> spp. frente a solução de NPAg.....	34
Tabela 6 – Concentração mínima bactericida para <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> e <i>L. ivanovii</i> , expostas por 24 e 48h a diferentes concentrações de NPAg.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
AgNP ou NPAg	Nanopartículas de Prata
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>Premier global biological materials resource and standards organization</i>
BHI	Caldo Infusão de Cérebro e Coração
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CRISPR	<i>Clusters of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
EDS	<i>Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
L	Litros
MBC	<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>
MEC	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
nm	Nanômetros
RTE	<i>Ready to Eat</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônias
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Carne de Aves.....	16
3.2 <i>Listeria</i> spp.....	18
3.3 Nanotecnologia e Nanopartículas de Prata.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Ativação das estirpes de <i>Listeria</i> spp.....	25
4.2 Preparo das soluções de NPAg testes.....	26
4.3 Avaliação da sensibilidade das estirpes de <i>Listeria</i> spp.....	27
4.4 Concentração mínima inibitória.....	28
4.5 Medida da concentração mínima bactericida.....	29
4.6 Avaliação da ação das NPAg frente a <i>Listeria</i> spp. inoculadas em amostras de frango desfiado temperado.....	31
4.7 Análise dos dados.....	32
4.7.1 Avaliação da sensibilidade das estirpes de <i>Listeria</i> spp.....	32
4.7.2 Concentração mínima inibitória.....	32
4.7.3 Avaliação da ação das NPAg frente a <i>Listeria</i> spp. inoculadas em amostras de frango desfiado temperado.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Avaliação da sensibilidade das estirpes de <i>Listeria</i> spp.....	33
5.2 Avaliação da concentração mínima inibitória.....	35
5.3 Medida da concentração mínima bactericida.....	36
5.4 Avaliação da ação das NPAg frente a <i>L. innocua</i> inoculadas em amostras de frango desfiado temperado.....	37
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, os abatedouros desempenham papel crucial no desenvolvimento econômico, gerando 4,1 milhões de empregos diretos e indiretos e mais de 100 mil famílias engajadas em um modelo de produção integrada. Este modelo além de preservar os trabalhadores no campo, agrega valor na alimentação humana, por meio da produção de carnes de frango e suína, juntamente com os ovos, as três proteínas mais consumidas no país (ABPA, 2020).

No setor de avicultura, assim como em outros setores da área de alimentos, as Boas Práticas de Fabricação e os cuidados com a segurança dos alimentos são pontos de extrema importância na garantia da qualidade microbiológica em toda a cadeia produtiva, desde a obtenção da matéria prima até o produto final.

Dentre os microrganismos importantes em alimentos, com especial atenção ao controle do ambiente de produção, destaca-se *Listeria spp.*, cuja espécie *Listeria monocytogenes*, é causadora de listeriose, que é uma doença de origem alimentar esporádica, mas com elevada letalidade.

As contaminações oriundas do ambiente de processamento podem ser inseridas nos alimentos, sendo de extrema importância, além da manutenção de um ambiente seguro para a produção, considerar a possibilidade de adição, nos produtos processados, agentes antimicrobianos que possam ampliar o controle, garantindo a oferta de um alimento seguro para o consumidor.

Os nanomateriais exibem excelentes propriedades antibacterianas podendo originar muitas aplicações potencialmente benéficas na indústria alimentícia (DUFFY et al., 2018), sendo que as Nanopartículas de Prata (NPAg) em especial, tem assumido destaque quando se trata de controle microbiológico em amplo espectro, por demonstrarem segurança e redução considerável de patógenos e indicadores.

Devido à possibilidade de contaminação pós-tratamento térmico, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a utilização das NPAg como agente antimicrobiano em frango desfiado produzido em indústria parceira.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência da ação antimicrobiana das nanopartículas de prata frente a culturas de *Listeria* spp., e sua aplicabilidade em frango desfiado temperado.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a sensibilidade de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovi* à nanopartículas de prata por meio do teste de disco-difusão.
- Identificar a concentração mínima inibitória de prata coloidal frente as estirpes de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovi*.
- Identificar a concentração mínima bactericida frente a *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovi*.
- Avaliar a ação das Nanopartículas de Prata frente a *Listeria* spp. previamente inoculada em amostras de frango desfiado temperado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Carne de aves

Para o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento carnes são as massas musculares e os demais tecidos que as acompanham, que poderão estar incluídas ou não da parte óssea, e declaradas aptas para serem consumidas por inspeção oficial (BRASIL, 2017).

O Brasil destaca-se no setor de abate de frangos, apresentando exponencial crescimento desde o ano 2000 com 4.613 mil toneladas, no ano de 2010 com 9.324 mil toneladas, e atingindo um total de 12.872 mil toneladas em 2022 (EMBRAPA, 2023). No mercado internacional os números também surpreendem, apresentando em 2022 o maior volume já registrado pelo setor em um único ano, totalizando 4,8 milhões de toneladas superando 2021 quando foram exportadas 4,6 milhões de toneladas (ABPA, 2023).

Na Figura 1 é demonstrado a evolução do abate de frangos entre os anos de 2000 a 2022 nas diferentes regiões do Brasil.

Figura 1 – Abate de frangos por regiões no Brasil, em mil toneladas, entre 2000 e 2022.



Fonte: EMBRAPA, (2023)

A carne de frango está amplamente disponível no mercado e é uma das mais

consumidas no mundo, devido ao seu alto valor nutritivo e preço acessível (BRITO, 2021). Em média, cada brasileiro consome 43 kg de carne frango por ano, *in natura* e nas mais variadas formas de processamento (EMBRAPA, 2019), sendo a proteína que apresenta o maior índice de consumo per capita (ABPA, 2020).

A importância da qualidade da carne medida através dos aspectos físicos, nutricionais, químicos, sensoriais e de segurança são determinantes para o consumo do produto e manutenção da saúde do consumidor (ALVES; ALBUQUERQUE; BATISTA, 2016).

Falhas no processamento, ou abusos no sistema durante a produção da proteína cárnea e os produtos cárneos, estão diretamente relacionadas ao estado microbiológico, causando deterioração e encurtamento do prazo de validade e perdas econômicas, o que se caracteriza em um grande desafio à segurança de alimentos dentro das indústria (DAS et al., 2019).

Os produtos derivados da carne são, de preferência, obtidos a partir de carne fresca que sofra um ou mais tipos de processo, entre eles, cozimento, salga, defumação ou mesmo somente a adição de condimentos e temperos. O processamento da carne fresca visa, além da elaboração de novos produtos, a redução da perecibilidade, de problemas com o transporte e com o armazenamento, além de vantagens com relação ao aumento da vida de prateleira e agregação de valor (EMBRAPA, 2016).

Para garantir a qualidade higiênico-sanitária em abatedouros de aves, normas e portarias como as Portarias N° 210 de 10 de Novembro de 1998 e N° 74 de 07 de maio de 2019 que estabelecem padronizações relativas às instalações, equipamentos, higiene do ambiente, esquema de trabalho do Serviço de Inspeção Federal (BRASIL, 1998; BRASIL, 2019), trazem norteadores para técnicas apropriadas de obtenção de inocuidade na produção de carnes.

Este controle é obtido por meio de intervenções durante o processamento como limpeza adequada, saneamento eficaz, descontaminação, tratamento térmico, resfriamento, congelamento, secagem, fermentação, uso de produtos químicos como acidulantes ou antimicrobianos, embalagem, armazenamento, distribuição e manuseio adequados, estes processos de controle aplicados corretamente permitirão a produção de produtos pós processamento térmico seguros para consumo (SOFOS, 2023).

Uma das formas de controle amplamente utilizadas no ambiente industrial é a

tecnologia de obstáculos, que consiste em aplicar barreiras combinadas para melhorar a estabilidade microbiana e a qualidade sensorial dos alimentos, bem como as suas propriedades nutricionais e econômicas. Exemplos destas barreiras são temperatura, podendo ser alta ou baixa, atividade de água, acidez, potencial redox, utilização de conservantes por exemplo, nitrito, sorbato, sulfito e microrganismos competitivos, por exemplo, bactérias do ácido láctico (LEISTNER, 2000).

Os produtos cárneos podem ser contaminados por microrganismos durante a manipulação e o processamento. Após ter sido contaminada, a carne oferece condições para que os microrganismos se multipliquem, tornando-se um potencial veiculador de bactérias patogênicas e uma ameaça à saúde do consumidor (SANTOS, 2021).

Estudos mostram que a carne de frango e produtos cárneos derivados desta matriz são fontes de *Listeria monocytogenes*, como Mamber et al. (2020) que em estudo realizado no período de 12 anos com produtos processados afirma que o frango é o produto de carne de aves pronto para consumo que sofre maior contaminação por *L. monocytogenes* além do microrganismo ter demonstrado, ao longo do estudo, alta taxa de persistência no ambiente industrial. Rothrock et al. (2019) também afirmam que os sistemas convencionais e alternativos para produção e processamento de aves são as principais fontes de contaminação por *L. monocytogenes* em alimentos.

3.2 *Listeria* spp.

O gênero *Listeria* é constituído por 19 espécies: *Listeria aquatic*, *Listeria booriae*, *Listeria cornellensis*, *Listeria denitrificans*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria floridensis*, *Listeria grandensis*, *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria marthii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria murrayi*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria riparia*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria seeligeri*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria welshimeri* (EUZÉBY, 2015).

Apesar de não apresentar patogenicidade a humanos *Listeria ivanovii* é amplamente reconhecida como patogênica para o gado e outros animais, e raramente infecta humanos (SKANDAMIS, 2022; SILVA et al., 2018).

Outra espécie de *Listeria* que também merece atenção por ter sido descrita em literaturas, sendo encontrada no trato intestinal de animais de sangue quente, foi

Listeria innocua, podendo as fezes ser efetivo meio de dispersão deste microrganismo (ABAYA et al., 2019). *L. monocytogenes* e *L. innocua* compartilham do mesmo nicho ecológico portanto a presença de positividade de *L. innocua* é indicativo para *L. monocytogenes* (AHIMED et al., 2022).

A presença de espécies de *Listeria* spp. em alimentos pode ser uma indicação de que não são fornecidas condições adequadas de higiene, uma vez que esta espécie está distribuída na natureza, no solo, água, vegetação, fezes de animais saudáveis, incluindo humanos, esgoto, resíduos de abatedouros, ração animal, frango resfriado e congelado (CUFAOGLU, AMBARCIOGLU, AYAZ, 2021; SILVA et al., 2018).

L. monocytogenes, um microrganismo muito estudado por ser patógeno para humanos é um bacilo curto, Gram positivo, catalase positivo e levemente β hemolítico, produtor de ácido, mas não de gás, a partir da fermentação do carboidrato xilose (ISO 11290-1:2017). Trata-se de um dos mais importantes patógenos alimentares, em nível mundial, sendo responsável pela listeriose, doença severa com alta taxa de mortalidade em grupos de risco como idosos, gestantes, recém-nascidos e imunodeprimidos (TONDO; BARTZ, 2019). Em adultos imunocomprometidos a listeriose invasiva poderá evoluir a meningite, encefalite ou septicemia; em mulheres grávidas, a doença se apresentará leve, semelhante à gripe caracterizada por calafrios súbitos, febre, dor de garganta, dor de cabeça, tontura, dor lombar, descoloração de urina e, ocasionalmente, diarreia, enquanto estas quase invariavelmente se recuperam sem complicações, a infecção do feto pode resultar em aborto espontâneo, natimorto ou parto prematuro com septicemia perinatal – uma infecção grave dos sistemas respiratório, circulatório e nervoso central que pode terminar fatalmente ou levar a retardo mental permanente (SKANDAMIS, 2022; SALDIVAR, 2018).

Existem fatores consideráveis que conferem importância a *L. monocytogenes* como um agente patogênico intracelular dificultando a ação e penetração de muitos antibióticos o que dificulta o tratamento de infecções listéricas (SKANDAMIS, 2022). Outro fator de acentuada relevância está relacionado as suas proteínas de superfície, as internalinas A e B, que auxiliam na adesão aos receptores da superfície celular, além da listeriolisina O, a qual, juntamente às fosfolipases, formam poros e permitem que a *L. monocytogenes* escape do fagossomo evitando a morte intracelular. Livre no citoplasma, este microrganismo pode dividir-se e induzir a polimerização da actina na

célula, onde ao impulsionar-se para a membrana da célula hospedeira, utilizando as projeções de filamentos formadas pela actina, o microrganismo se projeta às células vizinhas criando um ciclo de vida intracelular, e escapando da resposta imunológica do hospedeiro (FARLEY, 2022).

Considerando a necessidade e dificuldade de controle deste microrganismo, o Ministério da Agricultura instituiu, através da Instrução Normativa nº 9, de 8 de abril de 2009, os Procedimentos de Controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo, aplicados a estabelecimentos que fabricam produtos de origem animal, com o objetivo de monitorar e assegurar a inocuidade destes produtos em relação a este patógeno (BRASIL, 2009).

A dose infectante varia de indivíduo para indivíduo, mas experimentos indicam que a dose de 10^4 a 10^9 organismos é necessária para o desenvolvimento da doença, sendo que, para imunocomprometidos e pessoas com produção reduzida de ácido gástrico devido ao uso de antiácidos, agentes bloqueadores de histamina-2 (H2), inibidores da bomba de prótons ou cirurgia de úlcera a dose infectante possa ser menor (FARLEY, 2022).

L. monocytogenes apresenta elevada capacidade de adaptação a baixas temperaturas, tornando-a de elevada importância para as indústrias de alimentos. Tal adaptação deve-se a alteração da composição lipídica da membrana, expressando proteases acompanhantes, proteínas de choque frio, proteínas de aclimatação ao frio e acumulando solutos crioprotetores, como betaína e carnitina (THAKUR; ASRANI; PATIAL, 2018).

Os produtos prontos para o consumo à base de carne de aves podem ser uma fonte de *L. monocytogenes* e rotineiramente existem estudos, como o de MacLauchlin et al. (2020), que vincularam o patógeno ao surto envolvendo cinco casos relacionados ao consumo de frango cozido, o que indica alta taxa de positividade nesta matriz.

De acordo com o relatório da *European Food Safety Authority* (EFSA, 2019), em 2018 foram notificados 2549 casos de listeriose invasiva humana nos Estados Unidos, sendo que o envolvimento de carne e produtos cárneos representou 37,5% (com um número de teste de 57.861 amostras). Com a crescente globalização, a oferta e distribuição de alimentos em todo o mundo são cada vez mais intensas, agravando a possibilidade de propagação, mesmo em nível internacional, de produtos contaminados. O controle e regulação de *L. monocytogenes* em carnes prontas para

consumo é um grande desafio para os fabricantes e governos (ZHANG et al., 2021).

De acordo com dados obtidos pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention), que monitora a incidência dos principais patógenos de origem alimentar em 10 estados dos Estados Unidos (Tabela 1), constata-se que apesar da menor incidência de *L. monocytogenes*, a doença está relacionada à um alto índice de internação (98%), sendo também relevante o número de letalidade (16%), reafirmando a necessidade de atenção para este patógeno.

Tabela 1 - Número de infecções bacterianas diagnosticadas em laboratório, hospitalizações, mortes e incidência no ano de 2019 em 10 Estados dos Estados

Patógeno	Nº de Infecções	Nº de Internações (%)	Nº de óbitos(%)	Incidência
<i>Campylobacter</i>	9.731	1.988 (20)	26 (0,3)	19,5
<i>Salmonella</i>	8.556	2.430 (28)	46 (0,5)	17,1
<i>STEC</i>	3.127	660 (21)	10 (0,3)	6,3
<i>Shigella</i>	2.416	644 (27)	3 (0,1)	4,8
<i>Yersinia</i>	681	142 (21)	4 (0,6)	1,4
<i>Vibrio</i>	466	131 (28)	12 (2,6)	0,9
<i>Listeria</i>	134	131 (98)	21 (16)	0,3

Fonte: Tack et al. (2020)

Sendo sensível à pasteurização, *L. monocytogenes* geralmente entra em contato com produtos alimentícios pós tratamento térmico, no ambiente de processamento de alimentos, sendo um problema, principalmente, para os produtos prontos para consumo, pois geralmente não existe outra etapa de eliminação do patógeno entre a produção e o consumo. Embora mais frequentemente isolado de drenos de piso, esteiras transportadoras e áreas com condensação, *L. monocytogenes* também foi detectado em cubas de queijo e máquinas de envase, o que possibilita a contaminação pós-pasteurização (SKANDAMIS, 2022; JORDAN; MCAULIFFE, 2018).

A Instrução Normativa N° 161, de 1° de Julho de 2022, que estabelece padrões microbiológicos para alimentos, possui Anexo II destinado a padrão microbiológico exclusivo para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo (BRASIL, 2022), dada a importância e necessidade de atuação frente a tal microrganismo em possibilidade de recontaminação pós tratamentos e processamento.

Além de estarem diretamente associadas à matéria prima, *L. monocytogenes* formam biofilmes, sobre muitos materiais, dificultando a sua inativação pela higienização e, conseqüentemente, a sua remoção em indústrias de alimentos e

serviços de alimentação. *L. monocytogenes* persistentes em ambientes industriais formam biofilmes espessos, sendo uma importante estratégia de sobrevivência para esses microrganismos (TONDO; BARTZ, 2019).

Os biofilmes são comunidades microbianas agregadas, cercadas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, que se desenvolvem em uma ampla variedade de superfícies. As células microbianas dentro de um biofilme podem coordenar o seu comportamento para promover o crescimento e produzir substâncias poliméricas extracelulares, servindo como microambiente que permite aos microrganismos a interação e comunicação célula-célula. Esta estrutura, uma vez formada, protege as células de condições ambientais adversas com aumento da resistência microbiana à desidratação, à radiação UV, temperatura e pH extremos, alta salinidade, deficiência de nutrientes, vários desinfetantes e antibióticos (GEDAS; OLSZEWSKA, 2020).

A preocupação com este microrganismo no âmbito industrial é de interesse global, sendo relatado por Cufaoglu, Ambarcioglu e Ayaz (2021) alta prevalência de *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. associadas principalmente a matrizes de carnes e produtos cárneos na Turquia. Smith et al. (2019) também relatam que um dos maiores surtos de listeriose já ocorridos está associado a matriz de carne processada, no período de janeiro de 2017 a julho de 2018, na África do Sul, com um total de 1.060 casos e 27% de taxa de mortalidade.

3.3 Nanotecnologia e Nanopartículas de Prata

O prefixo “Nano” possui origem grega e significa um bilionésimo (0,000000001) de alguma coisa. Assim, nanômetro significa um bilionésimo do metro, usualmente representado por 10^{-9} m, ou pela unidade de medida *nm*. (TONET, 2019).

Mais de 60 países possuem iniciativas nacionais ligadas ao estudo das nanociências e nanotecnologia, e o total de investimento global ultrapassa US\$ 5 bilhões (ALVES et al., 2011). Em meados dos anos 1999 os Estados Unidos da América passaram a demonstrar publicamente seu interesse pelo ramo da Nanotecnologia estabelecendo uma iniciativa nacional não tecnológica, para já em 2003 assinarem a Lei de Investigação de Desenvolvimento da Nanotecnologia do Século XXI, concedendo 3,7 milhões de dólares para pesquisa na área (NAYFEH, 2018).

A nanotecnologia tem uma grande importância para a indústria alimentícia, devido à sua ampla área de aplicabilidade (RAHMAN et al., 2020), e atua melhorando os sabores, texturas, qualidade, prazo de validade e segurança de alimentos (DENG et al., 2021).

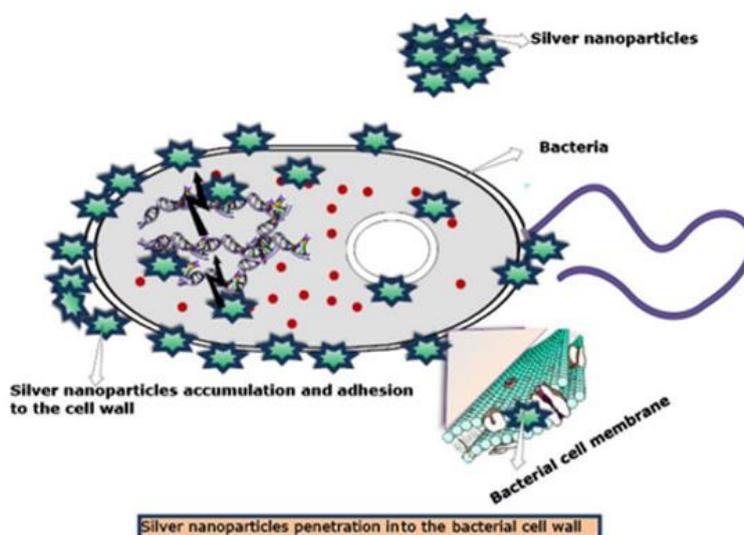
Neste contexto é importante destacar as NPAg por apresentarem alto potencial de aplicação na indústria alimentícia, saúde humana, meio ambiente pois com suas características antimicrobianas, possuem a capacidade de inibir muitas bactérias patogênicas e deterioradoras (RODRÍGUEZ-FELIX, 2021; JAVED et al., 2021).

Uma importante e considerável característica das NPAg é sua estabilidade e baixa reatividade, fazendo assim com que seja considerada uma importante inovação no ramo da nanotecnologia (DHAKA et al., 2023).

As nanopartículas de prata (NPAg) podem ser sintetizadas por duas técnicas conhecidas como bottom-up e top-down. Na técnica de bottom-up a formação ocorre à partir de átomos ou moléculas que se montam quimicamente usando princípios de reconhecimento molecular, e com a técnica top-down a formação ocorre à partir de entidades maiores que se dividem em peças menores até que possuam de 1 a 3 nanômetros ou bilionésimo de metro, essas peças passam a ter propriedades novas, diferentes das maiores (NAYFEH, 2018).

Existem várias hipóteses para explicação dos mecanismos de ação das nanopartículas, sendo a primeira delas a ação direta na membrana celular bacteriana, danificando e afetando a permeabilidade e diminuindo a atividade das enzimas membranosas, conforme apresentado na Figura 2. Com o aumento da permeabilidade das membranas bacterianas, ocorre inibição das funções de proteínas essenciais e enzimas respiratórias, o que resulta na quebra da replicação dos ácidos nucléicos e na inibição dos processos de transporte de íons. Outros fatores que influenciam proporcionalmente é a concentração de NPAg, e o tamanho das moléculas, sendo que, quanto maior a concentração, maior será a ação, e quanto menor a molécula, maior a tendência a interagir com as paredes celulares (RAJESHKUMAR; BHARATH; GEETHA, 2019; KAILASA et al., 2019).

Figura 2 - Mecanismo de ação das NPAg's nas células bacterianas.



Fonte: Rajeshkumar; Bharath; Geetha (2019)

De acordo com o *Guidelines for Drinking-water Quality*, da Organização Mundial da Saúde, podem ser encontradas em águas subterrâneas, superficiais e potáveis concentrações acima de 5 µg/L de prata sendo permitido para o tratamento de água potável concentrações acima de 50 µg/L. Somente um percentual máximo de 10 % é absorvido pelo organismo humano e animal, não ultrapassando a 7 µg por pessoa. A ingestão de uma dose máxima de até 0,01 µg/L pode ser tolerada sem risco ao longo de 70 anos de vida. O risco de toxicidade para a prata seria ultrapassar o valor de 10.000.000 µg absorvida pelo organismo, que poderia ocasionar a doença conhecida como Argiria, uma condição na qual a pele e os cabelos são descoloridos pela prata nos tecidos (WHO, 2017).

As NPAg apresentam eficiência também no controle de biofilmes formados por *L. monocytogens*, demonstrando maior inibição quanto maior a concentração de prata utilizada (KHAN et al., 2021).

Kumar et al. (2021) demonstraram um percentual de 97% de redução viral específica para SARS-CoV-2 em tecido impregnado com Nanopartículas de Prata. A fotodeposição direta das NPAg em tecido, também apresentou característica antimicrobiana quando exposto a culturas de microrganismos como *Escherichia coli* e *Aspergillus Niger*.

Bahrami et al. (2018) demonstraram, a eficiência antimicrobiana de filmes

comestíveis reforçados com NPAg, na inibição de microrganismos Gram positivos patogênicos como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *L. monocytogenes* e Gram negativos como *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiela pneumoniae*.

Cinco cepas de *Salmonella*, *Salmonella* Sofia, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Typhimurium (PT135), *Salmonella* Typhimurium (PT141), *Salmonella* Kiambu e cinco diferentes cepas de *Campylobacter* também apresentaram sensibilidade quando expostas as NPAg (DUFFY et al., 2018).

Na indústria de alimentos foram encontrados resultados satisfatórios ao utilizarem nanopartícula de prata como antimicrobiano em revestimento de filé de peito de frango incorporado em filme fabricado com Policloreto de Polivinila (PVC) a uma concentração de 0,5 % de prata. As bactérias Gram-negativas foram menos resistentes do que as Gram-positivas, e o produto apresentou ganho na vida de prateleira além de redução na oxidação lipídica (AZLIN-HASIM et al., 2016).

Resultados significativos também foram demonstrados por Arfat et al. (2017) para o uso das nanopartículas de prata em embalagens ativas para alimentos por inibir microrganismos como *L. monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sudeste de Minas Gerais, Campus Rio Pomba em parceria com uma empresa de alimentos da Zona da Mata mineira.

O experimento foi conduzido em três repetições, sendo as análises realizadas em duplicata.

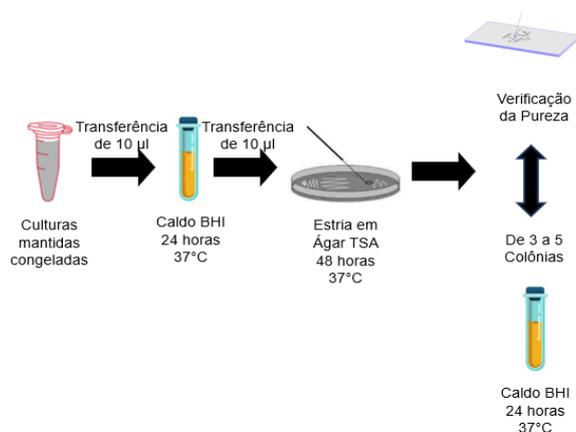
4.1 Ativação das estirpes de *Listeria* spp.

O efeito antimicrobiano da prata coloidal foi avaliado sob três estirpes de *Listeria*, quais sejam, *L. monocytogenes* ATCC 19111, *L. innocua* ATCC 33090 e *L. ivanovi* subsp. londoniensis ATCC BAA-139, obtidas junto da empresa de alimentos parceira, localizada na Zona da Mata Mineira.

A ativação das estirpes foi realizada por meio de repicagem de 10 µL através

de alça descartável da marca laborcare da cultura previamente descongelada, em Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI), da marca Merck, com incubação à 37 °C por 24h. Após este período, cada estirpe foi repicada através de alça descartável da marca laborcare, no volume de 10 µL em estrias, em placas contendo Ágar Triptona de Soja (TSA), da marca Merck, seguido de incubação a 37 °C por 48h. Para avaliação da pureza do inóculo, foi realizada a coloração de Gram. Em seguida foram retiradas 3 a 5 colônias para incubação em Caldo BHI, para dar início aos testes com a prata coloidal, conforme apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Ativação das estirpes de *Listeria* spp.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.2 Preparo das Soluções de NPAg de Teste

A solução de prata coloidal utilizada no estudo foi previamente caracterizada por Valente (2021), a qual apresentou concentração de 20 ± 2 mg/L de nanopartículas de prata em escala nanométricas de aproximadamente 35 a 40 nm (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização da solução contendo nanopartícula de prata (NPAg).

Amostra	Concentração	Metodologias		
		Tamanho 1 (AFM)	Tamanho 2 (MEV)	Deteção (EDS)
Solução NPAg	20 ± 2 (mg/L)	Aprox. 40 nm	Aprox. 35 nm ¹	Presença

Fonte: Valente 2021

¹ Média entre 278 medidas de partículas realizadas pelo software ImageJ

AFM: Microscopia de força atômica;

MEV: Microscopia eletrônica de varredura;

EDS: Espectroscopia de energia dispersiva.

Para a realização do experimento foram preparadas soluções com diferentes concentrações de Prata Coloidal (10, 15, 20, 25, 50 e 100%), conforme a Tabela 3, a partir da solução de NPAg caracterizada por Valente, 2021 (solução mãe), usando-se como solvente, o Caldo Demi Fraser da marca Merck.

Tabela 3 – Preparo das soluções de NPAg em diferentes concentrações

Proporção adicionada da solução de prata coloidal contendo 20 ± 2 mg/L de prata (Ag) (%)	Concentração em prata (Ag) da solução obtida (mg/L)
10	2
15	3
20	4
25	5
50	10
100	20

Fonte: Valente 2021.

4.3 Avaliação da sensibilidade de estirpes de *Listeria* spp.

A avaliação da sensibilidade das estirpes de *Listeria* spp. foi realizada pelo método do antibiograma, conforme recomendado pelo *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) (CLSI, 2018).

Placas contendo Meio Ágar Triptona de Soja da marca Merck foram estriadas usando-se swab embebido em solução contendo suspensão bacteriana de *L. monocytogenes* ATCC 19111, *L. innocua* ATCC 33090 e *L. ivanovi* subsp. *londoniensis* ATCC BAA-139, preparadas conforme item 4.1. Em seguida foram depositados sobre o meio de cultura discos contendo 6 mm de diâmetro, previamente autoclavados por 15 minutos a 121 °C, impregnados com a solução de prata coloidal nas concentrações citadas no item 4.2 por 15 minutos a 25 °C. As placas foram então incubadas a 37 °C por 48 horas.

Um disco comercial contendo o antibiótico ampicilina foi utilizado como controle positivo e um disco impregnado com Meio Caldo Demi Fraser como branco (CLSI, 2018).

A avaliação da sensibilidade de *Listeria* foi avaliada pela determinação do

diâmetro da zona de inibição formada ao redor dos discos impregnados com as soluções testes contendo NPAg, o qual foi comparado com medidas padrão estabelecidas por Djenane et al. (2011) que estabelece inibição a partir de halo de pelo menos 9 mm de diâmetro.

4.4 Concentração Mínima Inibitória

Através da técnica de microdiluições em placas, definida pelo *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, foi determinada a concentração inibitória mínima (MIC) das concentrações de 10, 15, 20, 25, 50 e 100% de Prata coloidal a que foram expostas *L. monocytogenes* ATCC 19111, *L. innocua* ATCC 33090, e *L. ivanovi* subsp. londoniensis ATCC BAA-139.

Foram preparadas soluções contendo as diferentes concentrações de NPAg conforme descrito no item 4.2 e a estas soluções, em duplicata, foram adicionadas as culturas das estipes de *Listeria* ativadas conforme item 4.1. e incubadas a 37°C por 48 horas.

Juntamente as amostras foram incubados controles positivos, contendo o meio de cultura sem adição das NPAg's com as estirpes de *Listeria*, e os controles negativos, apenas os meios de cultura com todas as concentrações das NPAg's sem a adição das estirpes de *Listeria*.

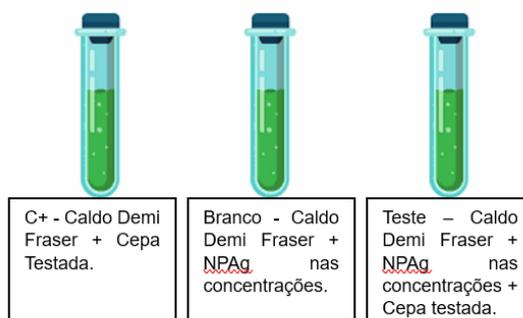
Os controles positivos e negativos são necessários para, além de garantirem a confiabilidade do processo, possibilitar a construção da curva de leitura, a partir do controle positivo (onde obtém-se o maior índice de turvação), e dos controles negativos, descontando o interferente da cor do meio de cultura.

Em cada placa contendo 96 poços, foram adicionados 200 µL da cultura microbiana, após 48 horas de exposição em diferentes concentrações de NPAg, conforme descrito em item 4.2.

Foram utilizadas soluções controles avaliadas juntamente às amostras, sendo elas: Solução controle branco onde foram realizadas as leituras dos meios contendo apenas as concentrações de prata com o meio de cultura, sem adição dos microrganismos, e o controle positivo, no qual a leitura foi realizada no meio de cultura adicionado das cepas em estudo, sem adição do antimicrobiano, conforme Figura 4.

A inibição microbiana foi determinada por medida de absorvância realizada por densidade óptica de crescimento a 595 nm, em leitora de microplacas iMark Biorad.

Figura 4 – Soluções utilizadas para determinação da concentração mínima inibitória.



Fonte: Autoria própria.

4.5 Medida da Concentração Mínima Bactericida

Para a medida da concentração mínima bactericida (MBC), foi utilizado o teste de macrodiluições onde foi adicionado, em 9 mL de Caldo Demi Fraser contendo as concentrações de 10, 15, 20, 25, 50 e 100% de NPAg's, conforme descrito no item 4.2, 1 mL do inóculo de suspensão bacteriana padronizada para concentração de 10^6 UFC/mL, seguido de incubação em temperatura de 37°C por 24 horas. Após incubação, foi realizada a avaliação visual e o plaqueamento em profundidade, de uma alíquota de 1 mL, em Ágar Triptona de Soja, seguido de incubação à 37°C por 48 horas, para evidenciar o crescimento (+) ou ausência de crescimento (-), além da concentração mínima bactericida.

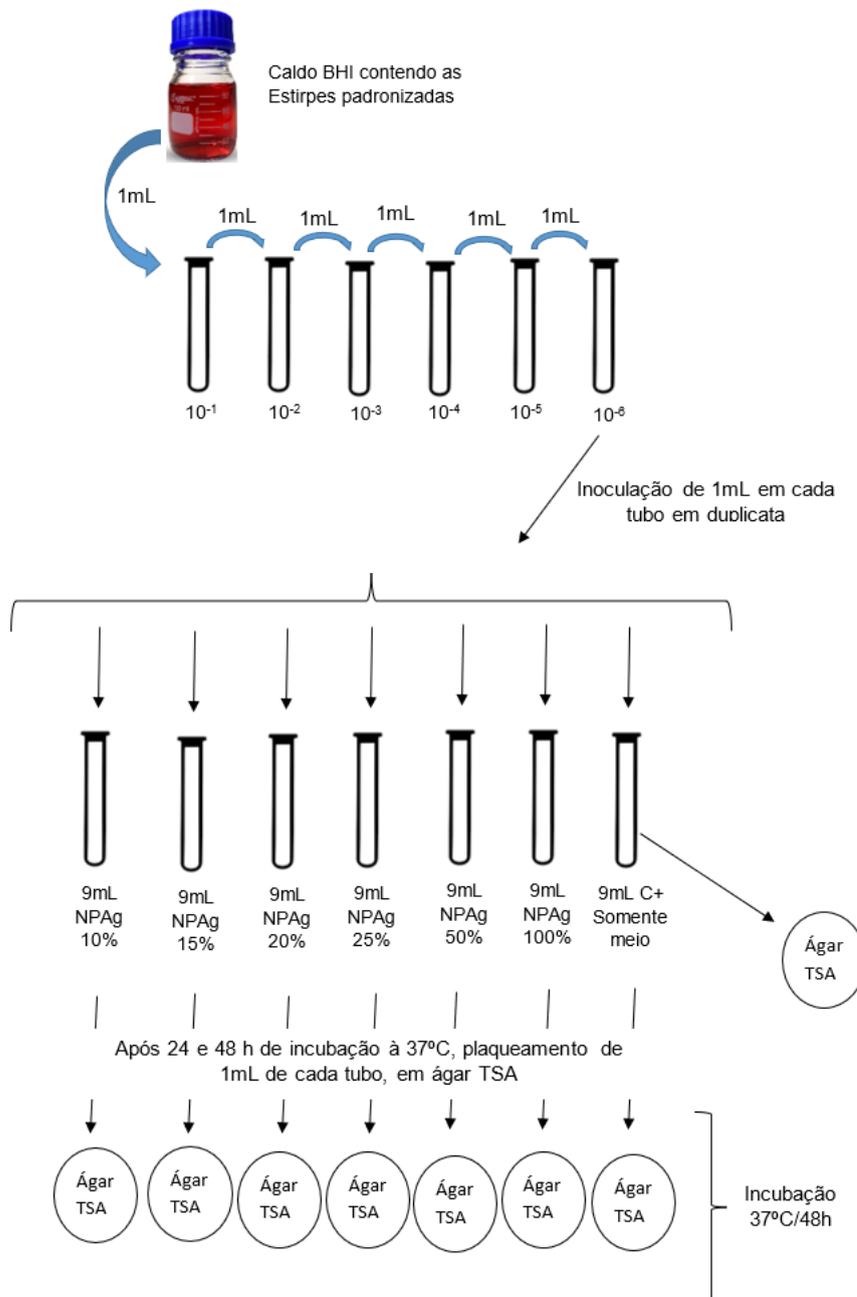
Após o plaqueamento, os tubos contendo 9mL de Caldo Demi Fraser, juntamente com as diferentes concentrações de NPAg's e o inóculo padronizado foram novamente incubados por mais 24h, atingindo um total de 48 horas de exposição às NPAg's. O procedimento foi repetido, com o plaqueamento de uma alíquota de 1 m, em Ágar Triptona de Soja, o qual foi incubado à 37°C por 48 horas para evidenciar o crescimento (+) ou ausência de crescimento (-) e determinação da concentração mínima bactericida.

Juntamente aos tubos de teste foram incubados controle positivo, caracterizado pela incubação do Caldo Demi Fraser com 1 mL de suspensão bacteriana, e o branco caracterizado pela incubação apenas do Caldo Demi Fraser contendo as concentrações de NPAg, conforme demonstrado na Figura 5 (CLSI, 2015; ARAUJO;

LONGO, 2016).

Os tubos referentes ao controle positivo, para cada uma das estirpes, foram quantificados.

Figura 5 – Esquema da realização do teste de concentração mínima bactericida.



Fonte: Autoria própria.

4.6 Avaliação da ação das NPAg frente a *Listeria* spp. inoculadas em amostras de frango desfiado temperado

Foi utilizado no presente estudo, o frango desfiado temperado, obtido pelo processo industrial, envolvendo as etapas de: injeção de salmoura, tangleamento, pré-cozimento, cozimento, desfiagem, embalagem primária, pesagem e selagem .

Para avaliar o efeito das NPAg frente à *Listeria* spp. selecionou-se a cepa que apresentou maior resistência nas etapas de avaliação da sensibilidade, de concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida, simulando-se uma pós contaminação das amostras.

As amostras de frango desfiado obtidas de processamento industrial foram previamente pesadas em porções de 100 g, e autoclavadas por 15 minutos a 121 °C para garantia de inocuidade do produto e inoculadas com 1 mL da cultura de *Listeria* spp. que se demonstrou ser mais resistente às NPAg.

O inóculo foi diluído em solução salina e padronizado para 10⁶ UFC/mL, garantindo contagem inicial de 10⁴ UFC/g no produto, a qual, quando encontrada no alimento, indica possibilidade de desenvolvimento de Listeriose.

Para avaliação da inibição, usou-se a solução de NPAg na concentração mínima inibitória.

Aplicou-se também um teste utilizando-se uma concentração de 33% de nanopartículas de prata (6,5 mg/L), ligeiramente inferior à mínima inibitória.

Após inoculação da espécie de maior resistência e das concentrações de NPAg testadas, as amostras de frango desfiado foram estocadas na temperatura de 2 a 8 °C por até 10 dias.

Imediatamente após a inoculação e nos tempos 2, 6 e 10 dias de armazenamento, as amostras de cada tratamento foram submetidas à determinação da contagem de *Listeria* spp. em placas de petrifilm® EL seguindo as recomendações do fabricante.

4.7 Análise dos dados

4.7.1 Avaliação da sensibilidade de estirpes de *Listeria* spp.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial. Para a avaliação do diâmetro do halo de inibição foram avaliados os fatores concentração: 2, 3, 4, 5, 10 e 20 mg/L de NPAg, além do controle positivo e do controle negativo; e como segundo fator as espécies, *L. ivanovii*, *L. innocua* e *L. monocytogenes*. Realizou-se a análise de variância e as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

4.7.2 Concentração mínima inibitória

Para avaliação do percentual de redução da densidade ótica, foi realizado experimento em esquema fatorial, considerando como fatores as concentrações de 2, 3, 4, 5, 10 e 20 mg/L de NPAg e para as espécies *L. ivanovii*, *L. innocua* e *L. monocytogenes*. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância e a avaliação da variável quantitativa foi realizada pela ANOVA para o modelo e os índices da regressão. As análises foram realizadas utilizando o Pacote ExpDes.pt (Ferreira, Cavalcanti e Nogueira, 2013) para o software R (R-Core Team, 2021).

4.7.3 Avaliação da ação das NPAg frente a *Listeria* spp. inoculadas em amostras de frango desfiado temperado

Para a análise das contagens de *L. innocua* (UFC/g) em amostras de frango desfiado respostas às concentrações de 6,5 e 10 mg/L de NPAg ao longo do tempo foi realizada análise de regressão utilizando o Microsoft Excel, incluído no Pacote Office 365.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da sensibilidade de estirpes de *Listeria* spp.

Na determinação da sensibilidade de *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. innocua* às diferentes concentrações de NPAg, não foi verificada interação significativa entre os fatores estirpes e concentrações de solução de NPAg, sendo os mesmos avaliados isoladamente.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, independente da estirpe avaliada, foi possível constatar inibição, caracterizada por diâmetro do halo maior que 9mm, conforme parâmetros estabelecidos por Djenane et al. (2011), apenas a partir de uma concentração de 10mg/L (50%).

O aumento na concentração da solução de NPAg para 20mg/L não promoveu efeito significativo na inibição das estirpes, não sendo, portanto, recomendado.

Tabela 4 – Diâmetro do halo de inibição das soluções contendo diferentes concentrações de NPAg sobre as estirpes de *Listeria* spp.

Concentração NPAg(mg/L)	Diâmetro do Halo (mm)*
2	6,22 e
3	6,69 de
4	7,16 cd
5	7,86 c
10	9,17 b
20	9,55 b
Branco	6,0 f
Controle Positivo	61 a

Fonte: Dados da Pesquisa

*Média de três repetições

Dalir et al. (2020) encontraram resultado semelhante quanto à concentração inibitória, na avaliação da sensibilidade por impregnação em disco, onde *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* ou seja microrganismos Gram-positivos somente passaram a ser inibidos a partir da concentração de 10 mg/L de NPAg. Os autores associam a ação a partir de concentração mais elevada do agente antimicrobiano devido a estrutura da parede celular dos microrganismos Gram-positivos e sua camada de peptidoglicano mais espessa.

De acordo com Azlin-Hasim et al. (2016), a maior resistência dos

microrganismos Gram-positivos aos antimicrobianos, em especial as NPAG, está associada às propriedades da estrutura celular, já que estes possuem camada de peptidoglicano mais espessa, o que dificulta ação das NPAG, a qual envolve penetração na célula bacteriana.

Valente et al. (2021), também observaram maior sensibilidade de microrganismos Gram-negativos, frente às NPAG's, onde todas as estirpes de *Salmonella* spp. expostas, apresentaram sensibilidade e ação efetiva da prata coloidal a partir da concentração de 3 mg/L.

L. monocytogenes são microrganismos que geralmente apresentam elevada resistência a antimicrobianos. Segundo Jordan e Mcaulife, (2018), genes *gacH* e *SSI*, indicativo de fator de resistência a situações de estresse, são atribuídos a *L. monocytogenes* como um marcador genético que lhe confere proteção para procedimentos de limpeza.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados da avaliação da resistência das estirpes estudadas, independente da concentração da solução de NPAG empregada.

Tabela 5 – Diâmetro do halo de inibição sobre estirpes de *Listeria spp* frente a solução de NPAG

Estirpes	Diâmetro do Halo de inibição (mm)
<i>L. innocua</i>	6,25 b
<i>L. ivanovii</i>	6,78 a
<i>L. monocytogenes</i>	6,75 a
CV (%)	7,53%

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de tukey à 5% de probabilidade.

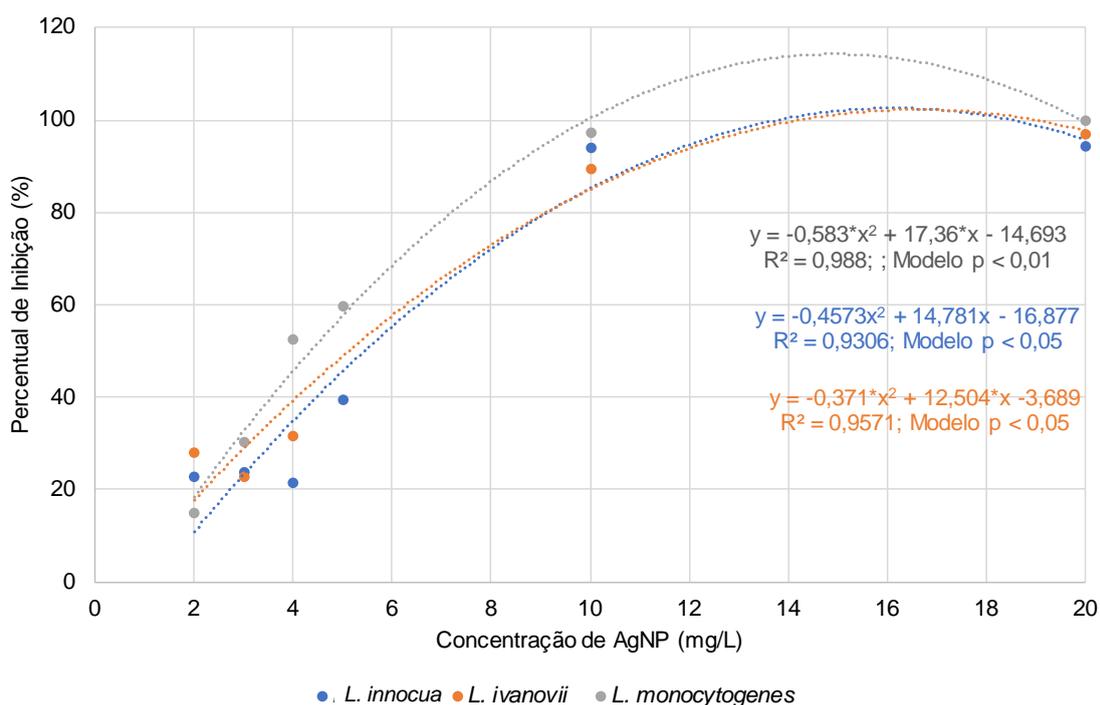
Observou-se (Tabela 5) que *L. innocua* apresentou maior resistência ($p < 0,05$), quando comparado à demais estirpes estudadas, caracterizada pelo menor diâmetro do halo de inibição, independente da concentração da solução de NPAG avaliada. Não foi verificada diferença significativa em relação à inibição de *L. ivanovii* e *L. monocytogenes*, frente às concentrações de NPAG estudadas.

5.2 Avaliação da concentração mínima inibitória

O teste de avaliação da concentração mínima inibitória (MIC), realizado em microplacas também evidenciou a eficiência progressiva das NPAg's conforme aumento das concentrações empregadas (Figura 6).

A análise de regressão linear para cada uma das bactérias em resposta à concentrações de NPAg seguiram modelos quadráticos, os quais foram significativos apenas para *L. innocua* e *L. monocytogenes*. Estes modelos demonstram uma inibição crescente até as concentrações entre 11 e 15 mg/L, seguindo a redução para a concentração de 20 mg/L. A inibição na concentração máxima foi maior para *L. monocytogenes* em comparação às outras duas espécies, o que demonstrou ser esta, a cepa mais sensível à ação das NPAg.

Figura 6– Percentual de redução da densidade óptica, após 48 horas de incubação.



Fonte: Dados da Pesquisa

Assim, os resultados indicam que as estirpes de *L. innocua* e *L. ivanovii* apresentaram maior resistência as NPAg's quando comparadas a *L. monocytogenes*.

Khan et al. 2021, através do teste de microdiluições em placas encontrou resultado próximo ao presente estudo como valor de MIC de 15,62 mg/L frente ao microrganismo *L. monocytogenes* quando expostas a prata coloidal.

Muthulakshmi et al. (2022) também consideraram que *L. monocytogenes* necessitou de concentrações elevadas de NPAg, superiores a 50% (10 mg/L), para sofrer total inibição.

5.3 Medida da concentração mínima bactericida.

Através do teste de macrodiluições, para a verificação da concentração mínima bactericida (MBC) para as estirpes de *L. innocua*, *L. ivanovii* e *L. monocytogenes*, (Tabela 6), observou-se que independente da concentração avaliada, não houve diferença entre o tempo de exposição às nanopartículas, ou seja, para uma mesma concentração, a resposta encontrada foi a mesma com 24 ou 48 horas de exposição das estirpes.

Entretanto, a sensibilidade variou conforme a estirpe. *L. monocytogenes* apresentou maior sensibilidade à solução de NPAg, sendo inibida a partir da concentração de 5 mg/L, enquanto as estirpes *L. innocua* e *L. ivanovii* foram inibidas a partir da concentração de 10mg/L. Importante destacar que o inóculo inicial para todas as estirpes estudadas foi padronizado para aproximadamente 10^8 UFC/mL.

Tabela 6 - Concentração mínima bactericida para *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii*, expostas por 24 e 48h a diferentes concentrações de NPAg.

Concentração solução de NPAg (mg/L)	Tempo de exposição (horas)	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>
2	24	+	+	+
	48	+	+	+
3	24	+	+	+
	48	+	+	+
4	24	+	+	+
	48	+	+	+
5	24	-	+	+
	48	-	+	+
10	24	-	-	-
	48	-	-	-
20	24	-	-	-
	48	-	-	-

Fonte: Dados da Pesquisa

Legenda: + Não Inibição, - Inibição, resultado referente a 3 repetições.

Lianou et al. (2023), ao avaliarem o genoma de *L. ivanovii* identificaram a presença da proteína CRISPR (*Clusters of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), a qual é um mecanismo de defesa encontrado no gene de alguns microrganismos, possibilitando maior resistência a situações de estresses, como em processos de higienização. Tal mecanismo pode estar associado à maior resistência desta estirpe, quando comparada à *L. monocytogenes* no presente estudo.

5.4 Avaliação da ação das NPAg frente a *L. innocua* inoculadas em amostras de frango desfiado temperado

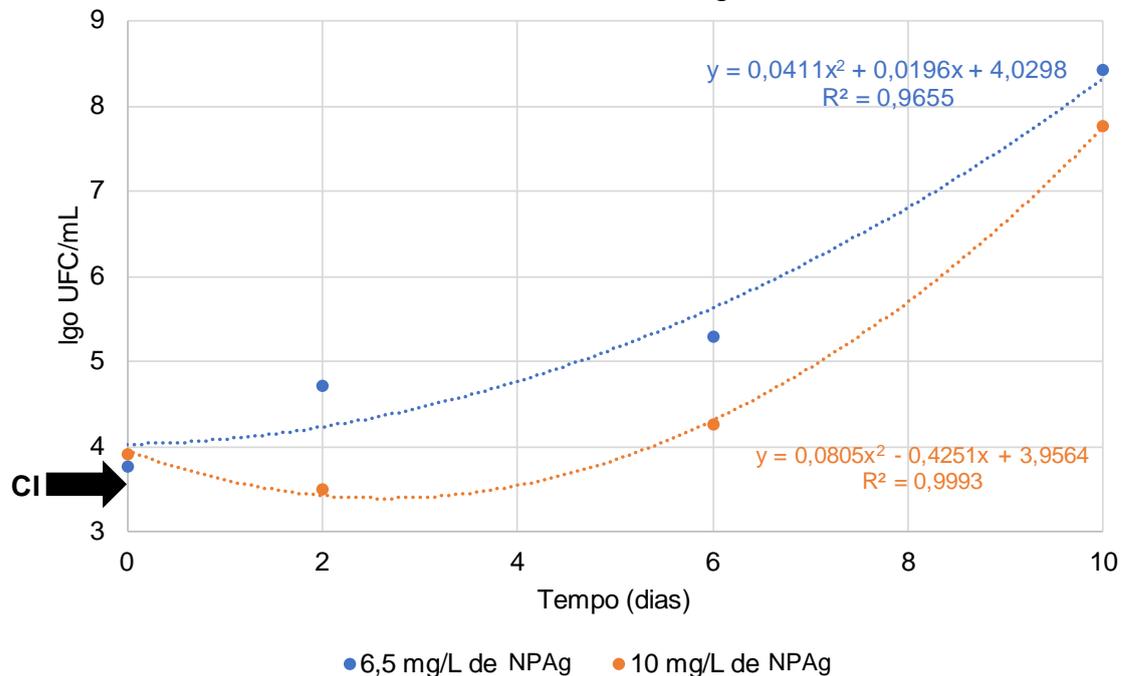
Para a avaliação da efetividade do uso direto de NPAg em amostras de frango desfiado temperado, optou-se por selecionar a cepa que apresentou maior resistência ao antimicrobiano, de forma a garantir que, na eliminação da cepa mais resistente, caso outro contaminante estivesse presente, provavelmente seria também eliminado.

Assim, para a simulação da contaminação pós tratamento térmico, as amostras de frango previamente cozidas e desfiadas, conforme processo adotado pela indústria parceira, foram separadas em porções de 100g, esterilizadas e inoculadas com 1 mL de uma cultura contendo aproximadamente 10^6 UFC/mL de *L. innocua*, garantindo uma contagem inicial de 10^4 UFC/g no produto final.

Considerando que a concentração mínima inibitória para *L. innocua* foi de 10 mg/L de NPAg, avaliou-se a adição desta concentração e de uma concentração um pouco inferior, de 6,5 mg/L de NPAg.

Observa-se (Figura 7) que na concentração de 10mg/L de NPAg, a contagem inicial permaneceu praticamente constante até o segundo dia de armazenamento em temperatura de refrigeração (2 a 8 °C) , enquanto na concentração de 6,5 mg/L de NPAg constatou-se desenvolvimento de *L. innocua* previamente inoculada, com apenas 2 dias de armazenamento sob as mesmas condições.

Figura 7 - Desenvolvimento de *L. innocua* (UFC/g) previamente inoculada, ao longo do armazenamento (2 a 8 °C) de frango desfiado.



Fonte: Dados da Pesquisa

*CI - Carga Inicial Inoculada no início do experimento.
Média de três repetições

Após 6 dias de armazenamento, independente da concentração de NPAg empregada, houve um aumento da carga microbiana de *L. innocua* inicialmente inoculada, demonstrando que não ocorreu o efeito inibitório desejável, das NPAg quando aplicadas diretamente sob amostras de frango desfiado, mas sim, uma manutenção da carga microbiana inicial, até aproximadamente 4 dias, na concentração de 10mg/mL de NPAg.

Embora não tenha ocorrido redução, sugere-se que quando a solução de NPAg foi utilizada na concentração de 10mg/L, possa ter acontecido um prolongamento da fase lag da cultura adicionada, mostrando um desenvolvimento mais lento quando comparado ao desenvolvimento na presença de solução de 6,5mg/L de NPAg.

De acordo com Thakur; Asrani e Patial, 2018, listeria é uma espécie bacteriana que apresenta vários mecanismos de adaptação, como a capacidade de sobrevivência e multiplicação em baixas temperaturas, através da modificação na composição da membrana, resultando num aumento de ácidos graxos insaturados e numa melhor fluidez na membrana, além da estimulação da expressão do fator sigma

de estresse geral (σ_B), que levará a transcrição de genes responsáveis por acumular solutos crioprotetores como glicina betaína e carnitina.

Além disso, em estudo realizado por Touche et al. (2023) foi possível verificar que *L. monocytogenes* apresentou capacidade de incorporar, somente em baixa temperatura (5 °C), ácidos graxos a sua membrana e aumentar sua taxa de crescimento, o que segundo os autores requer maior atenção a esse microrganismo em produtos ricos em lipídios e conservados em temperaturas de resfriamento.

De acordo com Matsumura et al. (2003) os íons de prata podem se ligar aos aminoácidos, cloretos, fosfatos e sulfuretos diminuindo assim a ação antimicrobiana da prata quando em contato a produtos processados devido a presença de alta concentração de proteína e sal. Tal característica da prata, aliada às características de adaptabilidade do microrganismo empregado no presente estudo, podem justificar o reduzido efeito da solução de NPAg durante a etapa de avaliação direta nas amostras de peito de frango desfiado, uma vez que o efeito da inibição in vitro tenha sido verificado.

6. CONCLUSÕES

A solução de prata coloidal demonstrou ação antimicrobiana quando em contato direto para as estirpes de *Listeria* spp. na concentração de no mínimo, 10 mg/L de NPAg.

A solução de prata coloidal testada apresentou atividade bacteriostática e bactericida contra as estirpes de *Listeria* spp. e a redução ocorreu proporcionalmente ao aumento de sua concentração.

A cepa de *L. innocua* demonstrou maior resistência quando comparada as outras duas estirpes utilizadas no estudo, fato que levou a sua predileção para o teste de simulação de pós contaminação em frango desfiado temperado.

Não foi verificado efeito inibitório da solução de NPAg sobre *L. innocua* previamente inoculada em amostras de peito de frango cozido, desfiado e temperado, quando usada diretamente no produto.

Este trabalho demonstrou importância de se estudar esse microrganismo e seu comportamento na matriz alimentar, devido a seus mecanismos de adaptação a ambientes diversos e a fatores estressantes.

Posteriores estudos se fazem necessários para evidenciar a possibilidade de

utilização das nanopartículas de prata em produtos *in natura*, para aumento de *shelf life*, avaliando a possibilidade de utilização dos nanocompósitos em outras etapas da cadeia produtiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, M.M.; LONGO, P. L.; Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, **Pharmacology / Scientific Article**, v.83, p.1-7, 2016.
- ABAYA, S.; BAYRAMB, L.Ç.; AYDINA, F.; MUSTAKC, H.K.; DIKERC, K.S.; EROL, I. Pathogenicity, genotyping and antibacterial susceptibility of the *Listeria* spp. recovered from stray dogs, **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 123-133, 2019.
- AHIMED, H.M.; HIKO, A.; ABDELLAH A.; MUKTAR Y.; GUTEMA F.D. Isolation and multidrug drug resistance profile of *Listeria* species in selected Dairy Farm's Operational stages in Oromia Regional State, Ethiopia, **Scientific African**, v.16, p. 1-9, 2022.
- ALVES, M.G.M.A.; ALBUQUERQUE, L.F.; BATISTA, A.S.M. Qualidade da Carne de Frangos de Corte. Ciências Agrárias, **Essentia**, Sobral, v. 17, n. 2, p. 64-86, 2016.
- ARFAT, Y.A.; EJAZ, M.; JACOB, H.; AHMED, J. Deciphering the potential of guar gum/Ag-Cu nanocomposite films as an active food packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 65-71, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, ABPA. Relatório Anual 2020. São Paulo: **ABPA**, 2020. Disponível em: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorioanual2020portuguesweb.pdf. Acesso em: 25 jan. 2022.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, ABPA. Relatório Anual 2022. São Paulo: **ABPA**, 2022. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>. Acesso em: 16 out. 2023.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, ABPA. Podcast 2022. Exportações de carne de frango – **ABPA**, Dezembro 2021. Disponível em: <https://abpa-br.org/abpdata-exportacoes-de-carne-de-frango-dezembro-2021/>. Acesso em: 30 jan. 2022.
- AZLIN-HASIM, S.; CRUZ-ROMERO, M.C.; MORRIS, M.A.; PADMANABHAN, S.C.; CUMMINS, E.; KERRY, J. P. The Potential Application of Antimicrobial Silver Polyvinyl Chloride Nanocomposite Films to Extend the Shelf-Life of Chicken Breast Fillets. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, p. 1661-1673, 2016.
- BAHRAMI, A.; MOKARRAM, R.R.; KHIABANI, M.S.; GHANBARZADEH, B.; SALEHI, R. Physico-mechanical and antimicrobial properties of tragacanth/ hydroxypropyl methylcellulose/beeswax edible films reinforced with silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 1103-1112, 2019.
- BANERJI, R.; MAHAMUNE, A.; SAROJ, S.D. Aqueous extracts of spices inhibit biofilm in *Listeria monocytogenes* by downregulating release of Edna. **LWT – Food Science and Tecnology**, v. 154, p. 1-7, 2021.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº210, de 10 de novembro de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 nov. 1998. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 06 out. 2023.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº9.013, de 29 de março de 2017. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 mar. 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/mpa/legislacao/legislacao-geral-da-pesca/decreto-no-9-013-de-29-03-2017.pdf/view>. Acesso em: 17 out. 2023.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº74, de 07 de maio de 2019. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 mai. 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n%C2%BA-74-de-7-de-maio-de-2019-87305783>. Acesso em: 26 jul. 2022.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 08 de abril de 2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 abr. 2009. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-de-patogenos/arquivos-controle-de-patogenos/in_09-_de_8_de_abril_de_2009.pdf. Acesso em: 16 out. 2023.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022. **Diário Oficial da União**, Brasília, 06 jul. 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366880>. Acesso em: 27 jul. 2022.

BRITO, J.M.S.; COELHO, R.M.D.; Características microbiológicas da carne de frango: uma revisão narrativa. **Brazilian Journal of Development**, v. 1, n. 6, p. 62781-62795, 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, **CLSI**. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 13. ed. Pennsylvania, USA, v.38, n.1, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, **CLSI**. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard. 10. ed. Pennsylvania, USA, v.35, n.2, 2015.

CUFAOGLU, G.; AMBARCIOGLU, P.; AYZAZ, N.D. Meta-analysis of the prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic resistant *L. monocytogenes* isolates from foods in Turkey. **LWT – Food Science and Technology**, v.144, p. 1-6, 2021.

DALIR, S.J.B.; DJAHANIANI, H.; NABATI, F.; HEKMATI, M. Characterization and the evaluation of antimicrobial activities of silver nanoparticles biosynthesized from *Carya illinoensis* leaf extract. **Heliyon**, v.6, p.1-7, 2020.

DAS, A.K.; NANDA, P.K.; DAS, A.; BISWAS, S. Hazards and Safety Issues of Meat and Meat Products. **Food Safety and Human Health**, P. 145-168, 2019.

DHAKA, A.; MALI, S. C.; SHARMA, S.; TRIVEDI, R. A review on biological synthesis of Silver nanoparticles and their potential applications. **Results in Chemistry**, v.6, p. 1-21, 2023.

DINIZ, C. G. Roteiro de aulas práticas: Bacteriologia. v.02, UFJF, 2018. Disponível em: <https://www.ufjf.br/microbiologia/files/2013/05/ROTEIRO-PARA-AULAS-PR%C3%81TICAS-bacteriologia-2018-vers%C3%A3o-02-2018.pdf>. Acesso em: 20 out 2022.

DJENANE, D., YANGÜELA, J., MONTAÑÉS, L., DJERBAL, M., RONCALÉS, P. Antimicrobial activity of Pistacia lentiscus and Satureja montana essential oils against Listeria monocytogenes CECT 935 using laboratory media: efficacy and synergistic potential in minced beef. **Food Control**, v.22, p. 1046-1053, 2011.

DENG, J.; DING, Q.M.; JIA, M.X.; LI, W.; ZUBERI, Z.; WANG, J.H.; REN, J.L.; FU, D.; ZENG, X.X.; LUO, J.F. Biosafety risk assessment of nanoparticles: Evidence from food case studies. **Environmental Pollution**, v. 275, p. 1-13, 2021.

DUFFY, L.L.; OSMOND-MCLEOD, M.J.; JUDY, J.; KING, T. Investigation into the antibacterial activity of silver, zinc oxide and copper oxide nanoparticles against poultry-relevant isolates of Salmonella and Campylobacter. **Food Control**, v.92, p. 293 – 300, 2018.

EFSA, The European union one health 2018 zoonoses report. **EFSA Journal**, v.17, p. 5926, 2019.

EMBRAPA. Árvores do conhecimento ovinos de corte. Agência EMBRAPA de informação tecnológica. Brasília: **EMBRAPA**, 2016. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/ovinos_de_corte/arvore/CONT000g3izohks02wx5ok0tf2hbweqanedo.html#. Acesso em: 21 jan. 2022.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Central de Inteligência de Aves e Suínos (Concórdia, SC). Mapas e Infográficos. Brasília: **EMBRAPA**, 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/mapas>. Acesso em: 10 jan. 2022.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Qualidade da Carne de Aves. Carne de Aves. **EMBRAPA**, 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-de-aves>. Acesso em: 10 jan. 2022.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Central de Inteligência de Aves e Suínos (Concórdia, SC). Mapas e Infográficos. Brasília: **EMBRAPA**, 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355242/9156104/cias-brasil-frangos-2022.jpg>. Acesso em: 16 out. 2023.

FARLEY M. M.; Listeria monocytogenes. **Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases** (Sixth Edition), p.797-802, 2022.

FERREIRA, E.; CAVALCANTI, P.; NOGUEIRA, D. ExpDes: An R Package for

ANOVA and Experimental Designs. **Applied Mathematics**, v. 5, p. 2952-2958, 2014. doi: 10.4236/am.2014.519280.

GARRETT, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z.B. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v.18, p.1049–1056, 2008

GEDAS, A.; OLSZEWSKA, M.A. Biofilm formation and resistance. **Recent Trends in Biofilm Science and Technology**, p.1-21, 2020.

ISO 11290-1:2017. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. **Microbiology of the food chain**. Part 1: Detection method, 2017.

JAVED, B.; IKRAM, M.; FAROOQ, F.; SULTANA, T.; MASHWANI, Z.; RAJA, N.I. Biogenesis of silver nanoparticles to treat cancer, diabetes, and microbial infections: a mechanistic overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p.2261-2275, 2021.

JARA, J.; PÉREZ-RAMOS, A.; SOLAR, G.; RODRÍGUEZ, J.M.; FERNÁNDEZ, L.; ORGAZ B. Role of *Lactobacillus* biofilms in *Listeria monocytogenes* adhesion to glass surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v.334, p.1-9, 2020.

JORDAN, K.; MCAULIFFE, O. *Listeria monocytogenes* in Foods. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.86, p.181-213, 2018.

KAILASA, S. K.; PARK, T.; ROHIT, J. V.; KODURU, J. R. Antimicrobial activity of silver nanoparticles. **Nanoparticles in Pharmacotherapy**, p.461-484, 2019.

KANNAN, S.; BALAKRISHNAN, J.; GOVINDASAMY, A. *Listeria monocytogenes* - Amended understanding of its pathogenesis with a complete picture of its membrane vesicles, quorum sensing, biofilm and invasion. **Microbial Pathogenesis**, v.149, p.1-9, 2020.

KHAN, A.A.; ALANAZI, A.M.; ALSAIF, N.; WANI, T.A.; BHAT, M.A. Pomegranate peel induced biogenic synthesis of silver nanoparticles and their multifaceted potential against intracellular pathogen and cancer. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.28, n. 8 p. 4191-4200, 2021.

KUMAR, A.; NATH, K.; PAREKH, Y.; ENAYATHULLAH, M.G.; BOKARA, K.K.; SINHAMAHAPATRA, A. Antimicrobial silver nanoparticle-photodeposited fabrics for SARS-Cov-2 destruction. **Colloid and Interface Science Communications**, v. 45, p.1-8, 2021.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v.55, p.181-186, 2000.

LIANOU, D.T.; SKOULAKIS, A.; MICHAEL, C.K.; KATSAROU, E.I.; CHATZOPOULOS, D.C.; SOLOMAKOS, N.; TSILIPOUNIDAKI K.; FLOROU Z.; CRIPPS P.J.; KATSAFADOU A.I.; VASILEIOU N.G.C.; DIMOVELI, K.S.; BOURGANOU, M.V.; LIAGKA, D.V.; PAPATSIROS, V.G.; KONTOU P.I.;

MAVROGIANNI, V.S.; CAROPRESE, M.; PETINAKI, E.; FTHENAKIS, G.C. O-038 Isolation of *Listeria ivanovii* from milk of ewes: Prevalence, association with milk quality, antibiotic susceptibility, predictors, whole genome sequence and phylogenetic relationships. **Animal - science proceedings**, v.14, p.82, 2023.

LIU, Y.Q.; LIU, Y.; TAY, J.H. The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.65, p.143–148, 2004.

MAMBER, S.W.; MOHR, T.B.; LEATHERS, C.; MBANDI, E.; BRONSTEIN, P.A.; BARLOW, K.; SILVERMAN, M.; ASTON, C.; IZSAK, Y.; SAINI, N.S.; LABARRE, D.; MINOCHA, U.; SMEDRA, J.; LEVINE, P.; KAUSE, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat and Poultry Product Verification Testing Samples from U.S. Department of Agriculture–Regulated Producing Establishments, 2005 through 2017. **Journal of Food Protection**, v.83, p.1598-1606, 2020.

MATSUMURA, Y.; YOSHIKATA, K.; KUNISAKI, S.; TSUCHIDO, T. Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with That of Silver Nitrate. **American Society for Microbiology**, v.69, p.4278-4281, 2003.

MCLAUCHLIN, J.; AIRD, H.; AMAR, C.; BARKER, C.; DALLMAN, T.; ELVIS, N.; JORGENSEN, F.; WILLIS, C. *Listeria monocytogenes* in Cooked Chicken: Detection of an Outbreak in the United Kingdom (2016 to 2017) and Analysis of *L. monocytogenes* from Unrelated Monitoring of Foods (2013 to 2017). **Journal of Food Protection**, v.83, p.2041-2052, 2020.

MUTHULAKSHMI, L.; SUGANYA, K.; MURUGAN, M.; ANNARAJ, J.; DURAIKANDIYAN, V.; FARRAJ, D.A.A.; ELSHIKH, M.S.; JULIET, A.; PASUPULETI, M.; AROCKIARAJ, J. Antibiofilm efficacy of novel biogenic silver nanoparticles from *Terminalia catappa* against food-borne *Listeria monocytogenes* ATCC 15,313 and mechanisms investigation in-vivo and in-vitro. **Journal of King Saud University – Science**, v.34, p.1-9, 2022.

NAYFEH, M. Particle-by-Particle Nanotechnology. **Fundamentals and Applications of Nano Silicon in Plasmonics and Fullerenes**, p.139-151, 2018.

PERRIN, M.; BEMER M.; DELAMARE C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. **Journal Of Clinical Microbiology**, v.41, p.5308 – 5309, 2003.

RAHMAN, U.; SAHAR, A.; ISHAQ, A.; Khalil, A.A. Design of Nanoparticles for Future Beverage Industry. **Nanoengineering in the Beverage Industry**, v.20, p.105–136, 2020.

RAJESHKUMAR, S.; BHARATH, L. V.; GEETHA R. Broad spectrum antibacterial silver nanoparticle green synthesis: Characterization, and mechanism of action. **Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles**, p.429-444, 2019.

R Core Team. **R**: A language and environment for statistical computing. R

Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021. Disponível em: <https://www.R-project.org/>; Acessado em: 29 de novembro de 2023.

RICHARDS A.T.; Food and Nutritional Analysis | Meat and Meat Products. **Encyclopedia of Analytical Science** (Third Edition). p.436-450, 2019.

RODRÍGUEZ-FELIX, F.; LÓPEZ-COTA, A.G.; MORENO-VÁSQUEZ, M.J.; GRACIANO-VERDUGO, A.Z.; QUINTERO-REYES, I.E.; DEL-TORO-SÁNCHEZ, C.L.; TAPIA-HERNÁNDEZ, J.A. Sustainable-green synthesis of silver nanoparticles using safflower (*Carthamus tinctorius* L.) waste extract and its antibacterial activity. **Heliyon**, v. 7, n. 4, p. 1-11, 2021.

ROTHROCK, M.J.; MICCICHE, A.C.; BODIE, A.R.; RICKE, S.C. Listeria Occurrence and Potential Control Strategies in Alternative and Conventional Poultry Processing and Retail. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v.3, p.1-15, 2019.

SALDIVAR, J.C.; DAVIS, M.L.; JOHNSON, M.G.; RICKE, S.C. Listeria monocytogenes Adaptation and Growth at Low Temperatures: Mechanisms and Implications for Foodborne Disease. **Food and Feed Safety Systems and Analysis**, p.227-248, 2018.

SANTOS, D.A.; AMARAL, G.V.; SARTORI, F.; SIMAS, J.V. A importância das condições higiênico-sanitárias em abatedouros: Uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p.1-16, 2021.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.M. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. 5 ed. São Paulo: **Blucher**, p. 535, 2018.

SKANDAMIS, P.N. Listeria monocytogenes. **Encyclopedia of Dairy Sciences** (Third edition), v. 4, p. 305-312, 2022.

SMITH, A.M.; TAU, P.N.; SMOUSE, S.L.; ALLAM, M.; ISMAIL, A.; RAMALWA, N.R.; DISENYENG, B.; NGOMANE, M.; THOMAS, J. Outbreak of Listeria monocytogenes in South Africa, 2017–2018: Laboratory Activities and Experiences Associated with Whole-Genome Sequencing Analysis of Isolates. **Foodborne Pathogens and disease**, v.16, p. 524-530, 2019.

SOFOS J.N. Safety of Food and Beverages: Meat and Meat Products. **Encyclopedia of Food Safety**, v.3, p.268-279, 2023.

TACK, D.M.; RAY, L.; GRIFFIN, P.M.; CIESLAK, P.R.; DUNN, J.; RISSMAN T.; JERVIS, R.; LATHROP, S.; MUSE, A.; DUWELL, M.; SMITH K.; TOBIN-D'ANGELO, M.; VUGIA, D.J.; KUFEL, J.Z.; WOLPERT, B.J.; TAUXE, R.; PAYNE, D.C. Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2016–2019. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, p. 509-514, 2020.

THAKUR, M.; ASRANI, R.K.; PATIAL, V. *Listeria monocytogenes*: A Food-Borne

Pathogen. **Foodborne Diseases**, p.157-192, 2018.

TONDO, E.C.; BARTZ, S. Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos, v.2, p.19-383, 2019.

TOUCHE, C.; HAMCHAOU, S.; QUILLERÉ, A.; DARSONVAL, M.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Growth of *Listeria monocytogenes* is promoted at low temperature when exogenous unsaturated fatty acids are incorporated in its membrane. **Food Microbiology**, p.1-8, 2023.

TOUNET, M.D.; LEONEL A.A., Nanociência e Nanotecnologia: uma revisão bibliográfica acerca das contribuições e desafios para o ensino de Física. **Caderno Brasileiro de Ensino de Física**, v. 36, n. 2, p. 431-456, 2019.

VALENTE, W. A., **Efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata em estirpes de Salmonella spp. da cadeia produtiva de frango de corte**. Orientador: Augusto Aloísio Benevenuto Júnior. 2021. 66f. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, 2021.

WHO. Guidelines for Drinking-water Quality. 4. ed. Genebra, Suíça, p. 541, 2017.

ZANG, X.; WANG, S.; CHEN, X.; QU, C. Review controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat and poultry products: An overview of outbreaks, current legislations, challenges, and future prospects. **Trends in Food Science & Technology**, v.116, p. 24-35, 2021.