



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Ana Guimarães Massia

**Efeito do congelamento e da temperatura de armazenamento na cinética de crescimento
de *Listeria monocytogenes* em salsichas**

Florianópolis
2022

Ana Guimarães Massia

Efeito do congelamento e da temperatura de armazenamento na cinética de crescimento de *Listeria monocytogenes* em salsichas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em engenharia de alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

Coorientadoras: Dr^a. Denise Adamoli Laroque

Dr^a. Jaqueline Oliveira de Moraes

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Massia, Ana Guimarães

Efeito do congelamento e da temperatura de armazenamento na cinética de crescimento de *Listeria monocytogenes* em salsichas / Ana Guimarães Massia ; orientador, Bruno Augusto Mattar Carciofi, coorientador, Denise Adamoli Laroque, coorientador, Jaqueline Oliveira Moraes, 2022.

94 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Segurança de alimentos. 3. Microbiologia preditiva. 4. Salsicha. 5. Vida útil. I. Carciofi, Bruno Augusto Mattar. II. Laroque, Denise Adamoli. III. Moraes, Jaqueline Oliveira IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. V. Título.

Ana Guimarães Massia

**EFEITO DO CONGELAMENTO E DA TEMPERATURA DE
ARMAZENAMENTO NA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Listeria monocytogenes*
EM SALSICHAS**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi - Presidente - UFSC

Prof. Dr. Wiaslan Figueiredo Martins - Membro externo - IFGoiano

Dr. Jhony Tiago Teleken - Membro Interno - UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Engenharia de Alimentos.

Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira
Coordenadora do Programa

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi
Orientador

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno, pela disposição, pelos ensinamentos, infinitas reuniões, paciência e principalmente pela oportunidade e confiança em mim e no meu trabalho. És uma inspiração e sou extremamente grata.

À minha coorientadora, Dr^a. Denise, pelo seu preciosismo que trouxe mais beleza ao trabalho, pela companhia nos momentos difíceis, pela ajuda no laboratório dès do preparo de material até nas madrugadas. Pela sua amizade que tornou o ambiente mais leve e com propósito, sua presença foi essencial.

À minha coorientadora Dr^a. Jaqueline, pela ajuda, pelos concelhos e ideias apresentadas a cada reunião e claro, pelo seu humor contagiante.

Aos meus pais, Rozeli e Ricardo, que se fazem presentes em todo e qualquer momento, pelo apoio, pelo amor e pela inspiração, sem vocês nada seria possível.

Ao meu namorado, Marcelo, pelo carinho e pela força que foram fundamentais para que eu me sentisse capaz e merecedora de realizar meus sonhos.

À minha amiga e colega Tais, pelo carinho e disposição em ajudar, pelo companheirismo nos momentos bons e ruins, pela escuta e pela amizade que levarei sempre comigo. Nossas diferenças nos aproximam e isso torna a nossa relação muito enriquecedora.

À Sandra e à Gabriela, pela ajuda nas incubações de centenas de salsichas e pela companhia nas noites e madrugadas no laboratório.

À Sandra e à Daniela, pelos ensinamentos e contribuições a este trabalho. Sou imensamente grata pela oportunidade de participar e contribuir com o projeto.

Aos colegas dos laboratórios PROFI e LIEB, pela ajuda e disponibilidade.

À todas as pessoas que contribuíram de alguma forma e acreditaram na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, pela possibilidade de desenvolvimento desta pesquisa.

À BRF pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos no início do trabalho.

RESUMO

Salsichas são alimentos prontos para o consumo que apresentam alto risco de contaminação após o processamento no manuseio, embalagem, comercialização e ambiente doméstico. Entre os contaminantes frequentes, há a *Listeria monocytogenes*. Essa bactéria se adapta a ambientes hostis de baixas temperaturas, podendo crescer rapidamente em temperatura ambiente e é associada a vários surtos de origem alimentar. A quebra da cadeia de frio é um risco à segurança desses produtos, que pode ser estimada por modelos matemáticos utilizando os dados de tempo-temperatura de armazenagem/manipulação e informações do patógeno alvo. O presente estudo avaliou a influência da armazenagem a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 90 dias no crescimento de *L. monocytogenes* em salsichas tipo *hot dog* condicionadas entre 7 e $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ de maneira isotérmica e temperatura variável. As salsichas foram caracterizadas quanto ao pH, atividade de água, concentração de cloreto de sódio e área, encontrando-se dentro da faixa que permite o desenvolvimento de *L. monocytogenes*. A capacidade de ajuste e predição do modelo matemático de Baranyi e Roberts para o crescimento do patógeno nas condições estudadas foi determinada. O procedimento experimental para determinação da cinética de crescimento de *L. monocytogenes* foi baseado na norma ISO 11290-2 para contagem em superfície de ágar ALOA e a contagem das bactérias ácido-láticas originalmente presentes pelo método de plaqueamento em profundidade com ágar MRS. Os parâmetros do modelo de Baranyi e Roberts foram obtidos pelo ajuste aos dados de crescimento isotérmico e a dependência desses com a temperatura foi descrita pelos modelos secundários da raiz quadrada e da potência, para os parâmetros velocidade específica máxima de crescimento e tempo da fase de adaptação ou fase lag, respectivamente. A duração dos períodos sob congelamento influenciou o parâmetro h_0 , que está relacionado ao estado fisiológico das células. Os ajustes dos modelos primário e secundários, para todas as condições isotérmicas estudadas, representaram bem os dados experimentais. A predição do modelo de Baranyi e Roberts para as condições não isotérmicas de crescimento foi validada e permitiu a investigação de diferentes cenários para avaliação de risco baseados na legislação RDC 331/2019 e IN 60/2019, demonstrando a importância da manutenção de temperaturas de refrigeração ao longo da vida útil do produto. Concentrações iniciais de *L. monocytogenes* mais altas e condições de crescimento em temperaturas variáveis apresentaram menores tempos para que o limite estabelecido pela legislação (10^2 UFC/g) fosse atingido, em comparação às cinéticas de crescimento em condições isotérmicas sob temperatura de refrigeração ($7\text{ }^{\circ}\text{C}$). A utilização de modelos matemáticos não isotérmicos para a simulação de cenários que comprometem a segurança do alimento possibilita uma análise de risco mais rápida e efetiva, contribuindo para o aumento de vida útil desses alimentos.

Palavras-chave: Segurança de alimentos; vida útil; alimentos prontos para o consumo; microbiologia preditiva; modelagem matemática.

ABSTRACT

Sausages are ready-to-eat foods that present a high risk of contamination after processing in handling, packaging, marketing, and the domestic environment. Among the frequent contaminants, there is *Listeria monocytogenes*. This bacterium adapts to hostile low-temperature environments, can grow rapidly at room temperature, and is associated with several foodborne outbreaks. Cold chain breakage is a safety risk for these products, which can be estimated by mathematical models using storage/handling time-temperature data and target pathogen information. The present study evaluated the influence of storage at -10 °C for up to 90 days on the growth of *L. monocytogenes* in hot dog sausages stored between 7 and 30 °C in an isothermal and variable temperature manner. The sausages' characteristics in terms of pH, water activity, sodium chloride concentration, and area, were within the range that allows the development of *L. monocytogenes*. The ability to fit and predict the mathematical model of Baranyi and Roberts for the growth of the pathogen under the conditions studied was determined. The experimental procedure for determining the growth kinetics of *L. monocytogenes* was based on the ISO 11290-2 standard for surface counting of ALOA agar and the counting of lactic acid bacteria originally present by the method of depth plating with MRS agar. The primary parameters of the Baranyi and Roberts model were obtained by fitting the isothermal growth data, and the dependence of these parameters on temperature was by the secondary Square Root and Power models for the parameters' maximum specific growth rate and lag phase time, respectively. The periods' duration under freezing influenced the h_0 parameter, which is linked to the physiological state of the cells. The fit of the primary and secondary models to the experimental data was good for all isothermal conditions studied. The prediction of the Baranyi and Roberts model for non-isothermal growth conditions was validated and allowed the investigation of different scenarios for risk assessment based on legislation RDC 331/2019 and IN 60/2019, demonstrating the importance of maintaining refrigeration temperatures throughout the life of the product. Higher initial concentrations of *L. monocytogenes* and growth conditions at variable temperatures showed shorter times for the limit established by legislation (10^2 CFU/g) to be reached compared to growth kinetics under isothermal conditions under refrigeration temperature (7 °C). The use of non-isothermal mathematical models to simulate scenarios that compromise food safety allows for faster and more effective risk analysis, contributing to the increase in the shelf life of these foods.

Keywords: Food safety; shelf life; ready-to-eat foods; predictive microbiology; mathematical modeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curva de crescimento microbiano em função do tempo.	28
Figura 2 – Etapas do preparo do inóculo de <i>L. monocytogenes</i>	37
Figura 3 – (a) Homogeneização, (b) remoção de líquido superficial e (c) acondicionamento das amostras de salsicha.....	38
Figura 4 –(a) Inoculação da <i>L. monocytogenes</i> e (b) massageamento das amostras de salsicha.	38
Figura 5 - Amostras de salsichas distribuídas em B.O.D.	39
Figura 6 - Etapas de separação de amostras nos Grupos A (sem congelamento prévio), B (com 30 dias de congelamento prévio) e C (com 90 dias de congelamento prévio).	40
Figura 7 - Perfis de temperatura ao longo do tempo para a medida da cinética de crescimento da <i>L. monocytogenes</i> em condição com temperatura (a) 7 °C com perturbação degrau a 30 °C e (b) 7 °C com perturbação degrau a 15 °C. A linha vermelha representa o perfil de temperatura e a linha preta é a predição do crescimento microbiano obtida pela plataforma <i>ComBase</i> (2021).	41
Figura 8 - Distribuição dos pontos de amostragem para os Grupos A(a), B(b) e C(c). Os pontos representam as amostragens e as linhas representam a predição realizada por meio da plataforma <i>ComBase</i> (2022).	42
Figura 9 - Etapa de amostragem para enumeração de <i>L. monocytogenes</i> e BAL em ágar ALOA e ágar MRS, respectivamente.	43
Figura 10 – Contagem da bactéria <i>L. monocytogenes</i> em salsicha na temperatura de congelamento -10 °C. Os pontos representam os dados experimentais, as barras o desvio padrão e a linha representativa da regressão linear aos dados.....	47
Figura 11 - Cinética de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em salsicha nas temperaturas de 7 (○), 10 (+), 15 (□), 20 (×) e 30 °C (Δ) sem congelamento prévio. As linhas azuis representam o ajuste do modelo Baranyi e Roberts aos dados experimentais, as barras são o desvio padrão e a linha tracejada vermelha é o limite estabelecido pela RDC 331/2019 (10^2 UFC/g = 50 UFC/cm ² = 5000 UFC/salsicha) quando se assume 2 UFC/g de salsicha inicialmente.	49
Figura 12 - Cinéticas de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em salsicha (<i>hot dog</i>) nas temperaturas de 7 (a), 10 (b), 15 (c), 20 (d) e 30 (e) °C sem (azul) e com congelamento prévio de 30 (vermelho) e 90 dias (verde) (Grupos A, B e C, respectivamente). Os pontos representam	

os dados experimentais, as linhas representam o ajuste do modelo Baranyi e Roberts, as barras são o desvio padrão e a linha tracejada vermelha é o limite RDC 331/2019 (10^2 UFC/g = 50 UFC/cm ² = 5000 UFC/salsicha) quando se assume 2 UFC/g de salsicha inicialmente.	50
Figura 13 - Parâmetro de crescimento primário: velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) obtido pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C sem (azul) e com congelamento prévio de 30 (vermelho) e 90 (verde) dias (Grupos A, B e C, respectivamente).	51
Figura 14 - Parâmetro de crescimento primário: tempo de fase lag (λ) obtido pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C sem (azul) e com congelamento prévio de 30 (vermelho) e 90 (verde) dias.	51
Figura 15 - Parâmetro de crescimento primário: tempo de fase lag (h_0) obtido pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C sem (azul) e com congelamento prévio de 30 (vermelho) e 90 (verde) dias.	52
Figura 16 – Ajuste do Modelo da Raiz Quadrada para o parâmetro μ . Os pontos representam os dados experimentais para as condições sem e com congelamento prévio de 30 e 90 dias, Grupos A (azul), B (vermelho) e C (verde), respectivamente e as linhas os ajustes do modelo.	58
Figura 17 - Modelo secundário da Potência para o parâmetro λ . Os pontos representam os dados experimentais para as condições sem e com congelamento prévio de 30 e 90 dias, Grupos A (azul), B (vermelho) e C (verde), respectivamente e as linhas os ajustes do modelo.	59
Figura 18 - Contagem de Bactérias Ácido Láticas em salsichas (<i>hot dog</i>) nas temperaturas de 7 (a), 10 (b), 15 (c), 20 (d) e 30 (e) °C sem (azul) e com congelamento prévio de 30 (vermelho) e 90 dias (verde) (Grupos A, B e C, respectivamente). Os pontos representam os dados experimentais.	61
Figura 19 - Predição do modelo Baranyi e Roberts para a cinética de crescimento da <i>L. monocytogenes</i> em condição (1) com temperatura (a) 7 °C com perturbação degrau a 30 °C e (b) ampliação para visualização do degrau a 30 °C. Os pontos representam os dados experimentais, a linha representa o ajuste do modelo e a linha vermelha o perfil de temperatura.	63
Figura 20 - Predição do modelo de Baranyi e Roberts para a cinética de crescimento da <i>L. monocytogenes</i> em condição (2) com temperatura (a) 7 °C com perturbação degrau a 15 °C e (b) ampliação para visualização do degrau a 15 °C. Os pontos representam os dados experimentais, a linha representa o ajuste do modelo e a linha vermelha o perfil de temperatura.	64

Figura 21 - Comparação dos tempos para atingir a concentração limite estabelecida pela RDC 331/2019 (10^2 UFC/g = 50 UFC/cm ² = 5000 UFC/salsicha) nas predições das condições não isotérmicas 1 (lado direito) e 2 (lado esquerdo) e isotérmica 7 °C (azul). Os pontos representam os dados experimentais, as linhas as predições do modelo Baranyi e Roberts, a linha tracejada vermelha o limite de 10^2 UFC/g e o tempo para que o limite seja atingido a partir de diferentes concentrações iniciais está indicado pelas setas.	66
Figura 22 - Comparação dos tempos obtidos para atingir a concentração limite estabelecida pela legislação RDC 331/2019 e IN 60:2019 nas predições das condições isotérmica 7 °C (azul), não isotérmica 1 (marrom) e não isotérmica 2 (roxo) a partir de diferentes concentrações iniciais (1, 2, 10 ou 20 UFC/g).	67
Figura 23 - Contagem de BAL para as condições não-isotérmicas 1 (a) e 2 (b). Os símbolos (▲) representam os dados experimentais e a linha tracejada o perfil de temperatura.	68
Figura 24 - Cinética de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em meio de cultivo BHI.	77
Figura 25 - Ajuste do modelo secundário exponencial para o parâmetro μ	80
Figura 26 – Ajuste do modelo secundário da Potência para o parâmetro λ	80
Figura 27 – Ajuste do modelo secundário de Arrhenius para o parâmetro λ	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão das análises físico-químicas da salsicha.....	46
Tabela 2 - Valores dos índices estatísticos para o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C sem e com congelamento prévio de 30 e 90 dias (Grupos A, B e C, respectivamente).....	52
Tabela 3 – Tempo necessário para as cinéticas de crescimento nas temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C sem e com congelamento prévio de 30 e 90 dias (Grupos A, B e C, respectivamente) atinjam o limite estabelecido pela RDC 331/2019 ($10^2\text{UFC/g} = 50\text{UFC/cm}^2 = 5000\text{UFC/salsicha}$) quando se assume 2 UFC/g de salsicha inicialmente.	53
Tabela 4 - Modelo secundário da Raiz Quadrada para o parâmetro μ para cada condição de incubação sem e com congelamento prévio de 30 e 90 dias, Grupos A, B e C, respectivamente.	58
Tabela 5 - Modelo secundário da Potência para o parâmetro λ para cada condição de incubação sem e com congelamento prévio de 30 e 90 dias, Grupos A, B e C, respectivamente.....	59
Tabela 6 - Valores dos índices estatísticos para a predição do modelo de Baranyi e Roberts para as condições com temperatura (1) 7 °C com perturbação degrau a 30 °C e (2) 7 °C com perturbação degrau a 15 °C.	65
Tabela 7 - Teste para determinação da concentração de inóculo, diluição e volume de inóculo inoculado.	78
Tabela 8 - Leituras de temperaturas isotérmicas por Datalogger	79
Tabela 9 - Parâmetros primários de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C sem e com congelamento prévio de 30 e 90 dias (Grupos A, B e C, respectivamente).	81
Tabela 10 - Contagens de <i>L. monocytogenes</i> em salsicha para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C sem congelamento prévio (Grupos A).....	82
Tabela 11 – Contagens de <i>L. monocytogenes</i> em salsicha para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C com congelamento prévio de 30 dias (Grupos B).	85
Tabela 12 – Contagens de <i>L. monocytogenes</i> em salsicha para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C com congelamento prévio de 90 dias (Grupos C).	88
Tabela 13 - Contagens de <i>L. monocytogenes</i> em salsicha para as condições não isotérmicas de temperatura 1 e 2.	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALOA – *Agar Listeria de Ottaviani & Agosti*
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- b – Parâmetro empírico
- BAL – Bactérias ácido lácticas
- BHI – *Brain Heart Infusion*
- B.O.D - Estufa incubadora para demanda bioquímica de oxigênio
- cond – Condições ambientais
- CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*
- CFHI - *Canadian Foundation for Healthcare Improvement*
- F(t) – Função de ajuste
- FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
- h_0 – Função de transformação do parâmetro q_0
- IN – Instrução Normativa
- ISO – *International Standart Organization*
- L – Concentração de Cl
- m – Parâmetro de curvatura
- m – Massa
- M_{Cl} - Massa molar do cloreto
- M_{NaCl} - Massa molar do cloreto de sódio
- MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária
- MRS – *Man Rogosa e Sharpe*
- NaCl – Cloreto de sódio
- N – População microbiana
- N_0 – População microbiana inicial
- $N_{máx}$ – População microbiana máxima
- p – Parâmetro a ser descrito pelos modelos secundários
- q – Função do estado fisiológico das células
- q_0 – Estado fisiológico inicial da célula
- t – Tempo
- T – Temperatura
- T_{min} – Temperatura mínima de observação do crescimento

PALCAM - *Polymyxin Acriflavine Lithium Chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol*

PCC – Ponto Crítico de Controle

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RMSE – Raiz do erro quadrático médio

SIF – Serviço de Inspeção Federal

TSAN – *Trypticase Soy Agar with Nalidixic Acid*

TSB - *Trypticase Soy Broth*

TSBN - *Trypticase Soy Broth with Nalidixic Acid*

TSBYE - *Trypticase Soy Broth with Yeast Extract*

UFC – Unidade Formadora de Colônia

V – Volume

x_{NaCl} – Concentração de cloreto de sódio

$\mu_{m\acute{a}x}$ – Velocidade específica máxima de crescimento

μ_{lag} – Velocidade específica de crescimento (fase lag)

μ_{exp} – Velocidade específica de crescimento (fase exponencial)

μ_{est} – Velocidade específica de crescimento (fase estacionária)

λ – Duração da fase lag

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	<i>Listeria monocytogenes</i> e listeriose	18
3.1.1	Capacidade adaptativa da <i>L. monocytogenes</i>.....	20
3.1.2	Contaminação de produtos cárneos prontos para consumo com <i>L. monocytogenes</i>.....	21
3.2	Salsicha	22
3.3	Importância da cadeia do frio para a segurança do alimento.....	24
3.4	Microbiologia Preditiva	26
3.4.1	Modelos primários de crescimento.....	27
3.4.1.1	<i>Modelo matemático de Baranyi e Roberts</i>	28
3.4.2	Modelos secundários.....	30
3.4.3	Modelos para crescimento não isotérmico	31
3.4.4	Validação	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	Amostras	35
4.2	Caracterização das salsichas	35
4.3	Microrganismo.....	36
4.3.1	Ativação da cepa e soluções estoque.....	36
4.4	Inóculo	36
4.5	Preparo e inoculação das salsichas	37
4.6	Condições de incubação das amostras	38
4.6.1	Incubação nas condições isotérmicas e congelamento prévio.....	39

4.6.2	Incubação em condições não isotérmicas	40
4.7	Amostragem.....	41
4.7.1	Frequência de amostragem	41
4.7.2	Enumeração de <i>L. monocytogenes</i>	42
4.8	Modelagem matemática do crescimento microbiano	43
4.8.1	Modelagem primária	43
4.8.2	Modelagem secundária	44
4.8.3	Predição do crescimento não isotérmico	44
4.8.4	Validação do modelo por análise estatística	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Caracterização da salsicha	46
5.2	Cinéticas de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em salsichas congeladas.....	46
5.3	Cinética de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em salsichas	49
5.4	Influência da temperatura nos parâmetros de crescimento	57
5.5	Contagem de Bactérias Ácido-Láticas em salsichas	60
5.6	Avaliação da capacidade preditiva do modelo para condição não isotérmica.....	62
5.6.1	Contagem de Bactérias Ácido Láticas em salsichas nas condições não isotérmicas	68
6	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO 1 - Cinética de crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em caldo BHI	77
	ANEXO 2 – Teste para determinação da concentração, diluição e volume do inóculo ...	78
	ANEXO 3 – Leituras de temperatura por <i>Datalogger</i>	79
	ANEXO 4 - Modelos secundários	80
	ANEXO 5 - Parâmetros primários de crescimento	81
	ANEXO 6 – Dados experimentais: contagem de <i>L. monocytogenes</i> em salsicha	82

1 INTRODUÇÃO

Listeriose é uma doença relacionada ao consumo de alimentos contaminados com *Listeria monocytogenes*. Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), no mundo, aproximadamente 1600 pessoas são acometidas por listeriose a cada ano e cerca de 260 pessoas morrem. A infecção é mais perigosa em mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos com idade superior a 65 anos e pessoas imunodeprimidas. Surto de listeriose são comumente associados a alimentos prontos para consumo armazenados sob refrigeração, pois possuem características que permitem o crescimento do patógeno. Salsichas do tipo *hot dog* estão entre os alimentos com maior risco de contaminação (CDC, 2021).

Tendo em vista que a salsicha é um produto muito consumido no Brasil e altamente susceptível à contaminação por *L. monocytogenes*, faz-se necessária a preocupação em oferecer um alimento seguro para os consumidores. A segurança de produtos alimentícios pode ser prejudicada a partir da proliferação de microrganismos patogênicos. Dentre os principais fatores que podem interferir na multiplicação microbiana em alimentos estão o pH, atividade de água e a temperatura (VAN IMPE et al., 1992). Estudos demonstram que a eficiência do controle de temperatura ao longo da vida útil de alimentos (cadeia do frio) é inferior ao ideal, aumentando significativamente o desperdício de alimentos e colocando em risco a segurança alimentar (MERCIER et al., 2017).

O Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil determina que o procedimento de controle de *L. monocytogenes* deve ter resultado negativo (ausência) em produtos de origem animal prontos para consumo que possuam pH maior que 4,4, atividade de água maior que 0,92 e concentração de cloreto de sódio menor que 10% (BRASIL, 2009). Por outro lado, a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC 331/2019 em conjunto com a Instrução Normativa – IN 60/2019 estabelece o limite de concentração de *L. monocytogenes* de 100 UFC/g para 5 unidades amostrais de alimentos prontos para consumo (BRASIL, 2019).

A fim de promover alimentos seguros, avaliações de crescimento microbiano são, normalmente, associadas a análises microbiológicas convencionais que implicam em longos tempos de espera, custos elevados e pouco valor preditivo. Dessa forma, a microbiologia preditiva é responsável pelo desenvolvimento de modelos matemáticos precisos e versáteis, capazes de descrever o crescimento microbiano em produtos alimentícios a partir de condições ambientais conhecidas (VAN IMPE et al., 2005).

Modelos preditivos que demonstram o crescimento de *L. monocytogenes* em salsichas representam uma ferramenta vantajosa para a indústria, órgãos de vigilância sanitária e consumidores. O investimento nessa área ajuda em melhoramento de processos térmicos, estabelecimento de pontos críticos de controle (PCC) e estimacão de riscos para a garantia da segurana do alimento e permite a predicão em situaões de variaões de temperatura na cadeia do frio em estudos de vida útil de alimentos. Além disso, torna o tempo de monitoramento microbiológico mais rápido e efetivo do que testes convencionais (STAVROPOULOU; BEZIRTZOGLU, 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar experimentalmente e propor modelos matemáticos para a cinética do crescimento de *Listeria monocytogenes* inoculadas em salsichas comerciais do tipo *hot dog* para entender o efeito do armazenamento sob congelamento no posterior desenvolvimento desta bactéria em temperaturas desde a refrigeração até próximo da condição ótima de crescimento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a cinética de crescimento de *L. monocytogenes* em salsichas sob condições isotérmicas de refrigeração (7 e 10 °C) e de abuso (15, 20 e 30 °C);
- Obter a contagem de *L. monocytogenes* em salsichas na temperatura de congelamento (-10 °C) ao longo do tempo de vida útil;
- Avaliar o impacto do congelamento (-10 °C) das salsichas após a inoculação no crescimento de *L. monocytogenes* sob condições isotérmicas de refrigeração (7 e 10 °C) e de abuso (15, 20 e 30 °C);
- Determinar o crescimento de *L. monocytogenes* em salsichas em condições não isotérmicas simulando alterações da cadeia do frio;
- Ajustar e avaliar o desempenho do modelo de Baranyi e Roberts para o crescimento de *L. monocytogenes* em salsichas nas condições isotérmicas analisadas para obtenção de parâmetros primários de crescimento;
- Estabelecer modelos secundários que descrevam a influência da temperatura nos parâmetros primários de crescimento;
- Avaliar a capacidade preditiva do modelo de Baranyi e Roberts para o crescimento de *L. monocytogenes* em salsichas sob condições de temperatura variável;
- Realizar o estudo de casos utilizando o modelo matemático obtido para prever a segurança das salsichas tipo *hot dog* considerando as condições armazenamento e a população inicial de *L. monocytogenes*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *LISTERIA MONOCYTOGENES* E LISTERIOSE

Bactérias do gênero *Listeria* possuem características como: Gram-positiva, não formadora de esporos, anaeróbia facultativa e formato de bastonetes com extremidades arredondadas. A temperatura de crescimento é entre 0 e 45 °C, sendo a temperatura ótima 37 °C. O crescimento pode acontecer entre pH 6 e 9 e em meios suplementados com concentração de cloreto de sódio de até 10% (p/v). A *Listeria* spp. pode ser facilmente inativada a 60 °C, com o valor D estimado entre 1,6 e 16,7 min quando presente em produtos cárneos (FELLOWS, 2019; MORRIS; POTTER, 2013).

A *L. monocytogenes* é o patógeno causador da listeriose, doença com alta taxa de mortalidade (20 a 30%) entre crianças, imunodeprimidos, idosos e mulheres grávidas. É visto que, com o aumento da globalização, a distribuição de alimentos pelo mundo se torna maior e, conseqüentemente, o risco de contaminações por essa doença aumenta. O controle e a regulamentação de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo são um desafio para as indústrias e governos (ZHANG et al., 2021).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), em pesquisas realizadas na década de 1990, cepas de *L. monocytogenes* estavam presentes em pelo menos um alimento do refrigerador de 64% dos pacientes que adquiriram listeriose. Esse fato dividiu as autoridades sobre a significância da ingestão de pequenas concentrações do patógeno, pois a incidência de casos de listeriose se mostrou muito menor que a exposição de pessoas ao microrganismo, principalmente para pessoas que não fazem parte do grupo de risco da doença (FAO, 2007).

A listeriose possui períodos de incubação que podem variar de duas semanas até três meses. Na forma não invasiva, os sintomas podem ser: febre, diarreia, dor de cabeça, náuseas, vômito, dores musculares e dor abdominal. Na forma invasiva, quando o patógeno penetra o tecido gastrointestinal, pode ocorrer meningite, encefalite e septicemia. Para mulheres grávidas, o risco de aborto é alto, a *L. monocytogenes* é capaz de atingir o líquido amniótico e o feto, nesse caso a gestante pode apresentar inicialmente apenas sintomas similares a um resfriado (FAO, 2007).

Dados estatísticos demonstraram que no ano de 2020 a população idosa no Brasil representava 14% e em 2100 a perspectiva é de 40,1% (IBGE, 2020). Dessa forma, com a

população envelhecendo e a tendência do hábito de consumo de alimentos prontos para consumo aumentando, é esperado que a preocupação com casos de listeriose se torne cada vez mais relevante. A notificação compulsória de listeriose no Brasil seria uma forma de investigação e documentação importante em termos de saúde pública no país (RODRIGUES; DE SÁ; DE MELO, 2016).

Idosos são o grupo de risco investigado no trabalho de Evans e Redmond (2015) acerca da manipulação doméstica de alimentos prontos para consumo. Segundo os autores, mais de 85% dos refrigeradores domésticos estavam em temperaturas acima de 5 °C e 41% dos produtos, relacionados a casos de listeriose, haviam ultrapassado a data de validade. Cinco graus celsius é a temperatura recomendada pelo governo do Reino Unido para reduzir o risco de listeriose em ambiente doméstico. Esses dados sugerem que tempos de armazenamento prolongados e temperaturas inadequadas de estocagem são grandes contribuintes para o aumento do risco de listeriose, quando comparados com a presença do patógeno isolado em cozinhas domésticas.

A listeriose ganhou mais atenção a partir de 2017, quando ocorreu o maior surto de origem alimentar de grande escala ocorrido até hoje, na África do Sul. Nesse episódio foram contaminadas, aproximadamente, 948 pessoas, 659 pacientes rastreados e 180 vítimas fatais, contabilizando uma taxa de mortalidade de 27% (NICD, 2018). Nos Estados Unidos, em 2011, melões provenientes de uma fazenda causaram um surto marcado como o maior registrado no país em 80 anos, somando 33 mortes (CDC, 2012).

Para a vigilância sanitária da União Europeia a alta taxa de casos fatais para o diagnóstico de listeriose, em torno de 15,6%, contribui para a classificação da doença transmitida por alimentos como a mais grave (EFSA, 2019).

No Brasil, segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde entre o período de 2007 a 2019 foram notificados 9030 surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentos (DTHA), com 160702 doentes e 146 óbitos. Dessas notificações, apenas 3275 (36,27%) tiveram a identificação do agente etiológico e a bactéria *L. monocytogenes* não é citada dentre os agentes identificados (BRASIL, 2021). Desta forma, observa-se a subnotificação de casos de listeriose no Brasil demonstrando a necessidade de estudos que visem entender o crescimento deste patógeno em alimentos com alto risco de contaminação.

3.1.1 Capacidade adaptativa da *L. monocytogenes*

A *Listeria spp.* está presente em ambientes que variam de solos (de criação de animais e plantações, por exemplo) às plantas de fábricas de produção de alimentos. Essa variedade de ambientes que permite seu desenvolvimento está diretamente associada à capacidade de adaptação da bactéria às novas condições ambientais (KALLIPOLITIS; GAHAN; PIVETEAU, 2020).

A persistência de *Listeria spp.* dentro das plantas de processamento está relacionada a sua habilidade de formação de biofilmes, podendo estar associada a outros microrganismos, tornando mais difícil a sua eliminação (ZHANG et al., 2021). Biofilmes são aglomerados de células que, ao produzirem polissacarídeos extracelulares, se aderem às superfícies e protegem as células de estresses externos, e ao contato com desinfetantes ou antimicrobianos (BUCHANAN et al., 2017). Kadam et al. (2013) testaram 143 cepas de *Listeria spp.* de diferentes origens e constataram que todas foram capazes de formar biofilmes.

Henriques e Fraqueza (2017) isolaram cepas de *Listeria spp.* de produtos cárneos prontos para consumo e de superfícies de contato com esses produtos em uma área de produção. A análise confirmou a produção de biofilmes nas superfícies e as cepas demonstraram resistência a mais de um tipo de desinfetante. Esse resultado invalida a técnica de rotação de produtos para o combate da *Listeria spp.*, pois o microrganismo é capaz de se adaptar a diferentes produtos.

Além da dificuldade para eliminação de *Listeria spp.* dentro de áreas de produção de alimentos, outra capacidade adaptativa bem característica desse patógeno acontece a baixas temperaturas (CORDERO et al., 2016). Dessa forma, pesquisas vêm sendo feitas a fim de elucidar esses mecanismos de adaptação a partir da ferramenta da microbiologia preditiva e técnicas de biologia molecular (ESHWAR et al., 2017; HONG et al., 2014).

O emprego de baixas temperaturas é uma barreira importante da cadeia de produção de alimentos e a capacidade da *Listeria spp.* de se adaptar a estas condições acontece em dois estágios (BARRIA; MALECKI; ARRAIANO, 2013). No primeiro estágio, as células expostas a baixas temperaturas são aclimatadas, enquanto no segundo estágio elas se adaptam, ou seja, as células se tornam capazes de crescer nessas condições, inicialmente em velocidades mais lentas. Essa mudança no metabolismo está relacionada a expressão de genes adaptativos que propiciam mudanças fisiológicas, como alterações na composição da membrana celular, síntese de *cold shock proteins* e substâncias crio protetoras (CORDERO et al., 2016).

Mudanças no metabolismo da *L. monocytogenes* a partir de estresses de temperatura foram avaliadas em condições de pré-incubação a baixas temperaturas e tempos de fase lag no crescimento subsequente. Francois et al. (2007) estudaram diferentes valores de temperatura e pH na pré-incubação de *L. monocytogenes* e verificaram a influência na distribuição da fase lag em uma abordagem de células únicas (*single cell*) com crescimento a 7 °C. Os autores concluíram que a fase lag em temperatura de refrigeração (7 °C) é menor se o inóculo for submetido a pré-incubação a temperaturas menores. Nas temperaturas de pré-incubação de 2, 4, 7 e 10 °C, os tempos de fase lag no crescimento a 7 °C foram 2,94; 4,36; 4,9 e 7,99 h, respectivamente. Além disso, demonstraram que a tendência de fase lag igual a zero aumenta à medida que a temperatura de pré-incubação diminui.

Dykes (2003) analisou o efeito de temperaturas de pré-incubação (4, 20 e 37 °C) no inóculo de cepas de *L. monocytogenes* e posterior incubação em mortadela fatiada refrigerada a 4 °C durante 6 semanas. A pré-incubação a 4 °C reduziu a fase lag do crescimento em mortadela, quando comparado às outras temperaturas de pré-incubação (20 e 37 °C).

Segundo Schmid et al. (2009), há um sistema de adaptação combinado ou sequencial de exposição a dois estresses, causando um sistema de proteção mútuo ou *cross-protection*. O estresse ao frio faz com que as células expressem genes (*cspA*, *cspD* e *cspB*) que melhoram sua adaptação a concentrações altas de NaCl. Bem como, em concentrações altas de NaCl, há indução de expressão de genes que melhoram a adaptação ao frio.

Hong et al. (2014) não observaram nenhuma resposta adaptativa em cinéticas de crescimento de um coquetel de 4 cepas de *L. monocytogenes* adaptadas ao frio a 5 °C durante 5 dias, posteriormente, inoculadas em melões armazenados de 10 a 30 °C.

Miladi et al. (2008) analisaram a cinética de *L. monocytogenes* inoculadas em fatias de salmão na temperatura de congelamento de -20 °C durante 10 meses. Após o período de armazenamento, foi observada a redução da população do patógeno, mudanças bioquímicas no perfil enzimático e redução no tamanho das unidades formadoras de colônias (UFC) em ágar TSA. Segundo os autores, essas mudanças podem estar relacionadas ao ambiente de baixa temperatura que resulta em redução de disponibilidade de nutrientes para a bactéria.

3.1.2 Contaminação de produtos cárneos prontos para consumo com *L. monocytogenes*

A *L. monocytogenes* está dispersa na natureza, o que proporciona grande variabilidade de fontes de contaminação. Plantas industriais de produção de alimentos são ambientes ricos

em nutrientes onde, uma vez contaminados, podem ser locais muito prováveis para o crescimento desse microrganismo. A produção moderna de alimentos possui equipamentos e rotas complexas, aumentando os riscos de contaminação cruzada nesse ambiente (ZHANG et al., 2021).

Alimentos prontos para consumo são, normalmente, consumidos sem preparos doméstico que permitam a eliminação de microrganismos patógenos. Surtos de listeriose são associados a esses alimentos, que são armazenados por longos períodos sob refrigeração, possibilitando o crescimento de *L. monocytogenes*. A contaminação desses alimentos no ambiente de fabricação ocorre depois da aplicação de algum método capaz de eliminar o patógeno (cozimento, por exemplo) e antes da etapa de embalagem (BUCHANAN et al., 2017).

Dentro da rota de produção dos alimentos prontos para consumo estão as etapas em abatedouros, produção, venda, consumo e transporte dos produtos sob temperatura controlada. Cada etapa possui diferentes possibilidades de contaminação por *L. monocytogenes*. As rotas de contaminação e as características intrínsecas de adaptação e crescimento dessa bactéria são múltiplas, e precisam ser mais bem esclarecidas e estudadas. A redução ou eliminação da *L. monocytogenes* desses locais é de extrema importância para limitar o acesso ao produto (KURPAS; WIECZOREK; OSEK, 2018).

Outra forma de contaminação de produtos por *L. monocytogenes* é pelo contato com superfícies ou utensílios com biofilmes. No trabalho de Dzieciol et al. (2016), biofilmes formados por *L. monocytogenes* e outros microrganismos foram encontrados em ralos, o que pode acarretar em proliferação do patógeno por aerossóis de água durante a limpeza ou pela contaminação cruzada devido ao contato com roupas e sapatos de trabalhadores, levando os patógenos para outros locais.

3.2 SALSICHA

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salsicha, por definição, salsicha é o produto cárneo industrializado, obtido da emulsão de carne de uma ou mais espécies de animais, adicionados de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial ou por processo de extrusão, e submetido a um processo térmico adequado. Podendo passar por processos alternativos como tingimento, depilação, defumação e a utilização de recheios e molhos (BRASIL, 2000).

Em 2007, o Codex Alimentarius propôs que cada país ficaria responsável por identificar e classificar produtos prontos para consumo que apresentam maior risco para a presença do patógeno *L. monocytogenes*. Cinco fatores fundamentais foram citados para os alimentos (CAC, 2009):

- quantidade e frequência de consumo;
- frequência e extensão da contaminação por *L. monocytogenes*;
- capacidade em permitir o desenvolvimento de *L. monocytogenes*;
- temperatura de refrigeração durante o armazenamento do produto;
- tempo de armazenamento (vida útil).

A salsicha passa por tratamento térmico capaz de inativar o patógeno, porém a contaminação pode ocorrer após esta etapa em função da manipulação subsequente (RODRIGUES, 2016).

Colaborando com a relação de alimentos prontos para consumo e *Listeria* spp., Pettinati, Oliveira e Ballian (2006) detectaram que 14% (56/394) amostras de salsicha coletadas no varejo da cidade de São Paulo entre junho de 2001 e outubro de 2002 continham *L. monocytogenes*. No período de maio de 2008 a julho de 2009, Ristori et al. (2014) avaliaram a presença de *L. monocytogenes* em produtos de origem animal coletados em mercados da cidade de São Paulo e confirmou a presença do patógeno em 34,4% (52/138) das amostras de salsicha analisadas. Andrade et al. (2014) observaram a presença de *L. monocytogenes* em 6,2% (8/127) das amostras de salsicha tipo *hot dog* vendidas a granel, escolhidas ao acaso, no Distrito Federal.

Cesar et al. (2011) observaram a ocorrência de *Listeria* spp e *L. monocytogenes* na linha de produção de salsichas obtidas de estabelecimentos sob inspeção do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Os autores coletaram amostras de matéria-prima cárnea, produto acabado e *swabs* do ambiente pós-cozimento. O *software @Risk* indicou uma probabilidade de presença de *L. monocytogenes* de 7 a 9% nas salsichas prontas. Além disso, os autores enfatizam a preocupação com a contaminação de *L. monocytogenes* em salsichas no Brasil devido à escassez de dados epidemiológicos, ausência de padrões e falta de informação ao consumidor, tanto em função da possibilidade de presença do patógeno quanto sobre a importância de aquecimento antes do consumo.

O trabalho de Pal, Labuza e Diez-Gonzalez (2008) estuda o crescimento de *L. monocytogenes* inoculadas em salsichas do tipo Frankfurt em diferentes condições de

armazenamento, tratamento e antimicrobianos. Foram testadas amostras com aplicação de alta pressão, adição de 2% de lactato de potássio e 0,2% de diacetato de sódio. Os autores evidenciam que o tratamento e antimicrobianos testados não são suficientes para evitar o crescimento do patógeno uma vez que o alimento é submetido a um abuso de temperatura (12 °C).

Byelashov et al. (2008) e Pal, Labuza e Diez-Gonzalez (2008) sugerem a implementação de protocolos e rótulos para alimentos com datas de validade baseadas em estudos que considerem tais cenários com abusos de temperatura, assegurando uma maior segurança para o consumidor.

3.3 IMPORTÂNCIA DA CADEIA DO FRIO PARA A SEGURANÇA DO ALIMENTO

A manutenção da temperatura correta de refrigeração ao longo dos estágios de produção, distribuição e venda dos alimentos perecíveis é chamado de cadeia do frio. A cadeia do frio inicia no momento de pré-resfriamento do produto já pronto, e termina quando o produto é retirado na geladeira para ser consumido. A dificuldade da manutenção da temperatura ao longo de diversos ambientes e situações se torna maior na área de alimentos, pela sensibilidade e necessidade de baixas temperaturas constantes. A manutenção envolve questões como embalagem correta, isolamento de temperatura e sistemas de controle (MERCIER et al., 2017).

Visto que a *L. monocytogenes* é capaz de permanecer em diversos ambientes de produção de alimentos ou em produtos, a manutenção da cadeia do frio está diretamente relacionada a evitar o crescimento deste microrganismo. Variações ou abusos de temperatura ao longo da vida útil dos produtos aumentam as chances de crescimento de patógenos (TAMPLIN, 2018)

Zeng et al. (2014), ao realizarem um mapeamento das condições de temperatura ao longo da cadeia do frio de alimentos refrigerados, observaram que durante o transporte as temperaturas ficaram acima de 7,2 °C em 0,24% do tempo e, em refrigeradores de estoque e amostradores, em 5% do tempo.

Tsaloumi et al. (2021) demonstraram a associação dos casos de listeriose de alimentos prontos para consumo fatiados no varejo com longos períodos de armazenamento e altas temperaturas em refrigeradores domésticos. Os produtos não apresentavam data de validade após fatiamento e segundo pesquisa realizada em 109 refrigeradores domésticos, 50% estavam com temperaturas entre 8 e 14 °C. A implementação de controle de temperatura em ambiente

doméstico reduziu o número de casos anuais de listeriose em 88% enquanto a determinação de data de validade (após fatiamento) de 14 dias apresentou diminuição de 97%. Resultados que evidenciam a importância de diminuição de temperatura para diminuição dos riscos de contaminação.

Pradhan et al. (2010) concluíram que a maior parte dos casos de mortes por listeriose originam-se de contaminações no varejo ao invés de locais de produção, principalmente pela manipulação dos produtos (corte, fracionamento e embalagem). As temperaturas de estocagem mantidas entre a indústria e o varejo, bem como do varejo com o ambiente doméstico, é um dos fatores com maior variabilidade e maiores dados representativos em análises de risco de consumo. Além disso, a diminuição da temperatura de estocagem aparece em destaque na redução do risco de listeriose em humanos associadas ao consumo de alimentos prontos para o consumo, independente da origem da contaminação.

Além das falhas no controle da temperatura para alimentos perecíveis serem capazes de acelerar o crescimento de patógenos, resulta também no possível recolhimento (*recall*) de alimentos impróprios para consumo. A ocorrência dessa prática representa não apenas um problema de saúde pública, mas também acarreta enormes perdas monetárias para as indústrias (DESAI et al., 2019; MERCIER et al., 2017). A Agência Canadense de Inspeção Alimentar (CFHI) reportou que no ano de 2021 até o mês de setembro, 21 itens alimentares já haviam tido episódios de recolhimento em função de contaminação por *L. monocytogenes* no país (AZIZ, 2021).

Recolhimento por abuso de temperatura evidenciam a importância da manutenção da cadeia do frio. A empresa norte americana Kraft anunciou a retirada do mercado de 7691 caixas de queijo com possível contaminação por *L. monocytogenes* em função de abusos de temperatura em um local de venda em 2014 (RIFFLE, 2014). Outra empresa norte americana, a Target fez a coleta de mais de 500 kg de alimentos prontos para consumo que foram expostos a altas temperaturas durante transporte no ano de 2018 (FSIS, 2018).

Algumas estratégias podem ser utilizadas para reduzir o desperdício de alimentos a partir de sistemas de controle e rastreabilidade de temperatura ao longo da vida útil de produtos. Esses sistemas podem aumentar a eficiência da cadeia do frio, diminuir episódios de recolhimento e melhorar a qualidade na promoção da segurança do alimento (MERCIER et al., 2017).

Uma alternativa muito eficiente para rastreabilidade de temperatura em conjunto com a utilização da ferramenta da microbiologia preditiva é apresentada no trabalho de Tamplin

(2018). O autor fala sobre a utilização de sensores de temperatura vinculados a modelos preditivos, gerando informações referentes a cadeia do frio em tempo real. Isto possibilita o mapeamento de abusos de temperatura e o quanto ações incorretas interferem na segurança e qualidade dos alimentos. Além disso, explicita como a colaboração entre indústrias de alimentos, tecnologias da informação e microbiologistas de alimentos pode ser benéfica para governos, empresas e consumidores.

3.4 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

Ross e McMeekin (1994) reportam que em 1983, no Simpósio da Sociedade de Bacteriologia Aplicada, já se falava sobre a predição de tempo de vida útil de alimentos por computadores como uma promessa a ser utilizada a partir do ano de 1993. Este interesse se deu em função de surtos de intoxicação alimentar na década de 1980, levando a uma conscientização maior de governantes e consumidores para o problema na cadeia de distribuição e produção de alimentos (MCMEEKIN et al., 2002).

Em 1992, o Ministério da Agricultura do Reino Unido lançava a ferramenta *Food Micromodel*, um banco de dados de microbiologia baseado em modelos matemáticos para o crescimento de patógenos em função de fatores ambientais. Esse episódio deu início a uma nova abordagem relacionada à segurança e qualidade dos alimentos chamada microbiologia preditiva (ROSS; MCMEEKIN, 1994). Outros governos, como Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia e União Europeia, também priorizaram pesquisas na área de segurança de alimentos (MCMEEKIN et al., 2002).

Os modelos matemáticos sigmóides são gerados a partir de cinéticas do crescimento, inativação ou sobrevivência de microrganismos em condições pré-definidas e controladas (pH, temperatura e atividade de água, por exemplo), em que equações matemáticas são ajustadas. A partir disso, uma base de dados é obtida e interpolações permitem a obtenção de resultados em condições diferentes, não necessariamente testadas experimentalmente. A predição do comportamento de microrganismos em alimentos permite acessar os efeitos de processamento, composição do produto e condições de estocagem na contaminação final e no momento que será consumido (WALLS; SCOTT, 1997).

O procedimento para a obtenção de modelos matemáticos para predições, segundo McMeekin et al. (2002), consiste na obtenção de um modelo primário que determine parâmetros de crescimento como velocidade específica máxima de crescimento, tempo para atingir a fase

estacionária, tempo para atingir determinado crescimento logarítmico ou taxa de morte celular. A partir disso, parte-se para a modelagem secundária que é utilizada para determinar a dependência dos parâmetros do modelo cinético com as condições ambientais. Para modelos preditivos, a junção dos modelos primários e secundários é incorporada, permitindo a geração de modelos de predição para condições ambientais variáveis.

3.4.1 Modelos primários de crescimento

Os modelos primários de crescimento descrevem a cinética de crescimento microbiano através de equações algébricas ou diferenciais sob condições ambientais conhecidas. Os parâmetros gerados pelo ajuste desses modelos são chamados de parâmetros primários (por exemplo, velocidade específica máxima de crescimento e fase lag) (RANJBARAN; CARCIOFI; DATTA, 2021).

Muitos modelos matemáticos de crescimento microbiano são construídos baseados em um bloco elementar, possibilitando descrever a evolução do crescimento da população por uma equação diferencial de primeira ordem (Equação 1) (BERNAERTS et al., 2004).

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu(t, N, cond)N(t) \quad (1)$$

na qual $N(t)$ é a contagem da população no instante t , e μ é a velocidade específica de crescimento da população, que depende das condições ambientais ($cond$) em que a população é submetida, além de fatores intrínsecos à própria população (LONGHI et al., 2017).

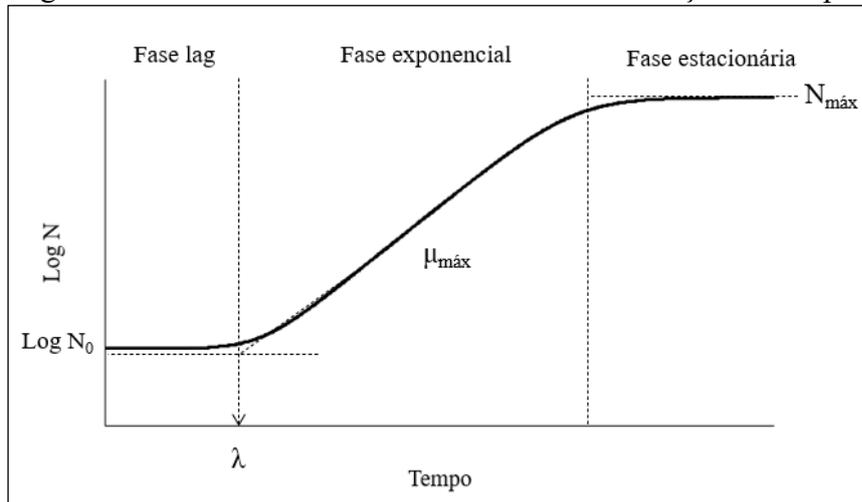
Desta forma, para condições ambientais constantes, a curva de crescimento comumente possui o formato sigmoidal, contendo três fases: latência (ou lag), exponencial e estacionária (Figura 1). Para descrever essas fases, três fatores podem ser adicionados a Equação 1, resultando na Equação 2 (VAN IMPE et al., 2005).

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu_{lag} \cdot \mu_{exp} \cdot \mu_{est} \cdot N(t) \quad (2)$$

O fator μ_{lag} é introduzido para descrever o comportamento da fase lag (função de ajuste), o fator μ_{exp} é a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) e o fator μ_{est}

representa o decréscimo gradual na velocidade específica máxima de crescimento, que resulta na fase estacionária (função de inibição) (BERNAERTS et al., 2004).

Figura 1 - Curva de crescimento microbiano em função do tempo.



Fonte: Adaptado de Silva (2015).

Na Figura 1, N_0 é concentração inicial de células. A fase lag (λ) é, em geral, um atraso em resposta a uma súbita mudança do ambiente pela população microbiana. É um momento de adaptação dos microrganismos para que obtenham as condições necessárias para crescer exponencialmente na fase seguinte (SWINNEN et al., 2004). Na fase exponencial, a população microbiana atinge a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$). A fase estacionária é alcançada após o crescimento exponencial ter finalizado, onde a população máxima ($N_{máx}$) no ambiente, sob determinadas condições, é atingida. Nessa última fase, a velocidade específica máxima de crescimento decai para valores próximos a zero (ZWIETERING et al., 1990).

O modelo de Baranyi e Roberts (1994) é muito utilizado na área de microbiologia preditiva. Os modelos propostos anteriormente não levaram em consideração mecanismos biológicos para descrever o comportamento de microrganismos. Esse fato dificulta algumas interpretações de parâmetros. O modelo de Baranyi e Roberts propõe o uso do chamado estado fisiológico das células (BARANYI; ROBERTS, 1994).

3.4.1.1 Modelo matemático de Baranyi e Roberts

O modelo de Baranyi e Roberts (1994) apresenta a Equação 3 como a função de ajuste do modelo para descrever a evolução do estado fisiológico das células em um novo ambiente.

$$\mu_{lag} = \frac{q(t)}{q(t) + 1} \quad (3)$$

na qual $q(t)$ é uma função que representa a evolução de uma substância crítica v , relacionada as funções enzimáticas envolvendo o microrganismo. A função $q(t)$ é obtida pela Equação 4.

$$\frac{dq(t)}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \cdot q(t) \quad (4)$$

sendo que $\mu_{m\acute{a}x}$ representa a velocidade específica máxima de crescimento da cultura microbiana, cuja razão é característica do ambiente atual.

A Equação 5 é a função de inibição do modelo e não possui mecanismos biológicos envolvidos.

$$\mu_{est} = 1 - \left(\frac{N(t)}{N_{m\acute{a}x}} \right)^m \quad (5)$$

em que N representa a população microbiana em função do tempo t , $N_{m\acute{a}x}$ é a população máxima atingida, μ_{est} é o decréscimo da velocidade específica máxima de crescimento na fase estacionária e m é o parâmetro de curvatura. Em muitos dos casos, o parâmetro m pode ser considerado igual a 1, pois normalmente não melhora de forma significativa a qualidade dos ajustes (LONGHI et al., 2017).

Considerando as equações citadas, a Equação 6 é a equação resultante do modelo para condições ambientais constantes.

$$\ln(N) = \ln(N_0) + \mu_{m\acute{a}x} \cdot F(t) - \ln \left(1 + \frac{\exp(\mu_{m\acute{a}x} \cdot F(t)) - 1}{\exp(\ln(N_{m\acute{a}x}) - \ln(N_0))} \right) \quad (6)$$

na qual N_0 é a população inicial de células e a função de ajuste $F(t)$ está representada na Equação 7.

$$F(t) = t + \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \ln \left(\frac{\exp(-\mu_{m\acute{a}x} \cdot t) + q_0}{1 + q_0} \right) \quad (7)$$

Os autores sugerem a transformação do parâmetro q_0 em h_0 , para que o ajuste se torne mais estável, através da relação mostrada na Equação 8.

$$h_0 = \ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right) \quad (8)$$

O parâmetro h_0 pode ser relacionado com a fase lag (λ) pela Equação 9.

$$\lambda = \frac{h_0}{\mu} \quad (9)$$

Dessa forma, considerando a Equação 8, a função de ajuste $F(t)$ (Equação 7) resulta na Equação 10.

$$F(t) = t + \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \ln (\exp(-\mu_{m\acute{a}x} \cdot t) + \exp(-h_0) - \exp(-\mu_{m\acute{a}x} \cdot t - h_0)) \quad (10)$$

A consideração do estado fisiológico inicial das células permite a interpretação da adaptação do microrganismo ao meio pelo tempo de duração da fase lag. Após a adaptação, as células estão aptas a crescerem de forma exponencial, até atingirem a concentração máxima de células, dada pela restrição do meio de cultivo (BARANYI; ROBERTS, 1994).

3.4.2 Modelos secundários

Modelos secundários descrevem como um parâmetro primário varia em função de uma condição ambiental. A velocidade específica máxima de crescimento e temperatura são os parâmetros primários e variáveis ambientais mais importantes na utilização de modelos secundários, respectivamente (RANJBARAN; CARCIOFI; DATTA, 2021)

O Modelo da Raiz Quadrada de Ratkowsky et al. (1983) é um modelo secundário que permite modelar a velocidade de crescimento de microrganismos em função da temperatura

utilizando parâmetros cardinais como a temperatura mínima de crescimento. A Equação 11 descreve o modelo.

$$\sqrt{p} = b(T - T_{\min}) \quad (11)$$

na qual p é o parâmetro primário de interesse a ser estimado, como por exemplo a velocidade específica máxima de crescimento, b uma constante obtida através de regressão, T é a temperatura e T_{\min} é uma temperatura teórica de mínimo crescimento microbiano obtida empiricamente.

Outro modelo secundário comumente utilizado em microbiologia preditiva é o modelo de Arrhenius, descrito pela Equação 12.

$$p = \alpha \exp\left(-\frac{b}{T}\right) \quad (12)$$

na qual p é a variável que será estimada, como por exemplo a fase lag (λ), α e b são parâmetros empíricos e T é a temperatura.

Sendo assim, qualquer equação que represente uma boa descrição dos parâmetros do modelo primário com a temperatura pode ser usada como modelo secundário, como por exemplo, as equações logarítmica (Equação 13), exponencial (Equação 14) ou potencial (Equação 15) (LONGHI, 2012).

$$p = a + b \cdot \log(T) \quad (13)$$

$$p = a + b \cdot \exp(T) \quad (14)$$

$$p = a \cdot (T^b) \quad (15)$$

Sendo que a e b são parâmetros empíricos, p é o parâmetro a ser estimado e T é a temperatura.

3.4.3 Modelos para crescimento não isotérmico

Enquanto os modelos primários podem ser usados como equações algébricas (forma integrada) para condições do ambiente constantes, modelos secundários são necessários para

(i) para estimar parâmetros primários sob condições ambientais constantes que não tenham sido, necessariamente, obtidos experimentalmente ou (ii) sob condições ambientais variáveis utilizando modelos primários na forma diferencial. Desta forma, modelos para crescimento não isotérmico (em condições ambientais variáveis) são a junção das equações primárias e secundárias em que na maior parte do tempo requer uma solução numérica (PIN; METRIS; BARANYI, 2013; RANJBARAN; CARCIOFI; DATTA, 2021).

Entre os *softwares* disponíveis, a plataforma *ComBase* (www.combase.cc) é um banco de dados que pode ser utilizado como ferramenta para predições microbiológicas, facilitando a obtenção de soluções numéricas de modelos para crescimento em condições isotérmicas e não isotérmicas. A plataforma possibilita a obtenção de cinéticas de crescimento e inativação de microrganismos em diversas matrizes alimentícias e a simulação de diferentes fatores ambientais, como temperatura, pH e atividade de água (*ComBase*, 2021). O site possui mais de 60.000 estudos depositados, segundo Lira et al. (2020) foi o *software* mais utilizado de microbiologia preditiva, com uma representação de 38% comparado aos demais modelos matemáticos para crescimento não isotérmicos.

Pelo fato de modelos para crescimento não isotérmico serem uma junção das equações de modelos primários com secundários, esses permitem a modelagem em situações ambientais variáveis. Baranyi e Roberts (1994) trazem as seguintes equações diferenciais (Equações 16 e 17) para descrever este comportamento. Nessa abordagem os parâmetros são funções das variações ambientais.

$$\frac{d(\ln(N(t)))}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \left[\frac{1}{1 + e^{-q(t)}} \right] [1 - \exp(\ln(N(t)) - \ln(N_{m\acute{a}x}))] \quad (16)$$

$$\frac{d(\ln(q(t)))}{dt} = \mu \quad (17)$$

Onde μ e $\ln(N_{m\acute{a}x})$ são funções da temperatura que podem ser descritos por modelos secundários. As condições iniciais para a solução das Equações 16 e 17 estão nas Equações 18 e 19, respectivamente.

$$\ln(N(t = 0)) = \ln(N_0) \quad (18)$$

$$\ln(q(t = 0)) = \ln(q_0) \quad (19)$$

Sendo que q_0 é relacionado com o parâmetro h_0 pela Equação 8.

3.4.4 Validação

Cullen e Frey (1999) trazem alguns conceitos que expressam erros e podem ser abordados quando se trata de validação de modelos matemáticos. Entre eles: (i) a homogeneidade que é ampla para os alimentos e não é abordada nos atuais modelos matemáticos; (ii) a integralidade pelo fato de ser menosprezada, os modelos são simplificações e não descrevem efeitos como a ecologia microbiana dos alimentos; (iii) a função de erro do modelo, que é a escolha de modelos matemáticos que são apenas uma aproximação da realidade; (iv) o erro de medição, que são os erros somados ao longo dos procedimentos de coleta de dados e amostragem com suas limitações e; (v) o procedimento numérico que engloba os erros de procedimentos de ajuste do modelo.

Índices estatísticos são muito utilizados para avaliar a capacidade preditiva de modelos matemáticos. Os mais empregados são o fator bias (fator de tendência), fator de exatidão (do inglês: *accuracy*), RMSE (raiz do erro quadrático médio) e coeficiente de determinação (R^2) apresentados nas Equações 20, 21, 22 e 23, respectivamente.

$$fator\ bias = 10^{\left(\frac{\sum \log(valor_{predito}/valor_{observado})}{n}\right)} \quad (20)$$

$$fator\ de\ exatidão = 10^{\left(\frac{\sum |\log(valor_{predito}/valor_{observado})|}{n}\right)} \quad (21)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (valor_{predito} - valor_{observado})^2}{n}} \quad (22)$$

$$R^2 = \frac{\sum (valor_{predito} - valor_{observado\ médio})^2}{\sum (valor_{observado} - valor_{observado\ médio})^2} \quad (23)$$

Estes índices permitem a interpretação dos resultados preditos em comparação aos dados experimentais. Valores iguais a 1 para os fatores bias e exatidão representam que os valores preditos e experimentais são exatamente iguais. Para resultados de bias maior que 1 é dito que os valores preditos estão em uma margem segura (*fail-safe*), enquanto valores menores

que 1 são ditos não seguros (*fail-dangerous*). O fator de exatidão apresenta valor igual ou maior que 1, quanto maior, menos precisa está a predição (ROSS, 1996). O índice RMSE mede a raiz quadrática média entre os erros (preditos e experimentais) e, quanto menor for o seu valor, maior será a capacidade do modelo descrever os dados. Para o índice RMSE os valores são expressos em unidades da medida experimental, diferente dos demais. Valores de R^2 quanto mais próximos a 1 significam maior correlação entre os valores preditos com os valores experimentais, significando que maior é a capacidade do modelo em representar os dados experimentais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

As salsichas em embalagens termoencolhíveis de 5 kg do tipo *hot dog* da marca Perdigão foram enviadas na forma congelada diretamente da fábrica da Brasil Foods S.A situada no município de Videira-SC. As salsichas foram encaminhadas no dia de fabricação, em caixa térmica, para o Laboratório de Engenharia Biológica (LIEB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Florianópolis-SC e armazenadas a -18 °C até o momento das análises. A preparo das amostras foi realizado em até 5 dias após o recebimento das salsichas do mesmo lote de fabricação.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SALSICHAS

Foram realizadas medidas de pH, atividade de água, concentração de cloreto de sódio (NaCl) e área superficial específica. As análises foram realizadas em 3 salsichas por embalagem, à temperatura ambiente.

O pH foi determinado com auxílio de pHmetro (Testo 205) para meios semissólidos com resolução de 0,01, previamente calibrado com soluções tampões de pH 4 e 7.

A atividade de água foi determinada utilizando o equipamento Aqualab (modelo SERIES 3TE) com resolução de 0,001, previamente calibrado com água destilada. Uma fatia de amostra foi colocada no recipiente de leitura.

A determinação da concentração de cloreto de sódio (NaCl) foi baseada na metodologia proposta por Aliño et al. (2011). Foram pesadas 4 g de amostra e trituradas em dispersor (Tecnal, modelo Te147) por um minuto com aproximadamente 150 mL de água destilada. A solução foi colocada em balão volumétrico de 200 mL que foi preenchido com água destilada e centrifugada em tubos do tipo Falcon em centrífuga (Centrífuga Sigma, modelo 4k15) durante 15 min à 5000 rpm. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi transferida para o equipamento de leitura de concentração de cloretos (Cole Parmer, modelo 926), previamente calibrado. O equipamento fornece medição direta em mg/L de NaCl, para a consideração das diluições realizadas e obtenção da concentração por 100 g de amostra é utilizada a Equação 24, apresentada a seguir.

$$x_{NaCl} = \left(\frac{L \cdot V}{m}\right) \left(\frac{M_{NaCl}}{M_{Cl}}\right) 100 \quad (24)$$

na qual x_{NaCl} é a concentração de cloreto de sódio (g NaCl/100 g de salsicha), L é o valor da leitura no equipamento (em mg NaCl/L de solução), V é o volume em líquido da solução (amostra com água destilada) (L), m é a massa da amostra (g), M_{NaCl} e M_{Cl} são as massas molares de NaCl (58,44 g/mol) e Cl (35,45 g/mol), respectivamente.

As medidas das áreas superficiais das salsichas foram realizadas com uma régua, a partir da determinação do comprimento e do perímetro nas duas extremidades.

4.3 MICRORGANISMO

A bactéria utilizada nos experimentos foi a *L. monocytogenes* (CCT 7474), isolada de salsicha no laboratório da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), adquirida da Coleção de Culturas Tropicais, da Fundação André Tosello, na forma liofilizada.

4.3.1 Ativação da cepa e soluções estoque

A cepa de *L. monocytogenes* foi reidratada e cultivada em caldo BHI (Brain Heart Infusion) a 37 °C por 24 h, conforme recomendação do fornecedor.

Cepas estoques foram preparadas adicionando 1 mL do inóculo e 0,5 mL de glicerol em tubos do tipo Eppendorf e armazenadas a -80 °C. Cepas de trabalho foram preparadas realizando estria na superfície do ágar ALOA (*Agar Listeria Ottaviani & Agosti*) com auxílio de uma alça bacteriológica. As placas estriadas foram incubadas invertidas em estufa incubadora (B.O.D) a 37 °C por 48 h e após o crescimento, foram armazenadas a 4 °C. As cepas de trabalho foram renovadas periodicamente.

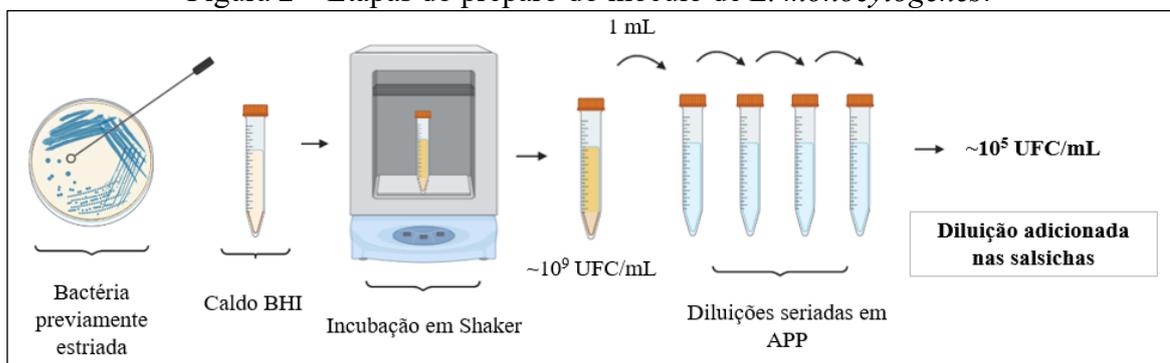
4.4 INÓCULO

Para o preparo do inóculo, uma unidade formadora de colônia (UFC) foi retirada da placa contendo a cepa de trabalho com o auxílio de uma alça bacteriológica e foi adicionada a um tubo de ensaio estéril descartável contendo 10 mL de meio de cultura BHI. O tubo foi mantido sob agitação (200 rpm) em agitador tipo *shaker* (Tecnal, TE-4200) a 37 °C por 7 h. O

tempo foi definido previamente como o tempo de início da fase estacionária, quando o inóculo atinge uma concentração de 10^9 UFC/mL, conforme apresentado no ANEXO 1.

O inóculo foi submetido a diluição seriada, adicionando 1 mL do inóculo em 9 mL de água peptonada estéril 0,1% até resultar em uma concentração de 10^5 UFC/mL posteriormente adicionado às amostras (Figura 2). Essa concentração foi definida em ensaios prévios (ANEXO 2) a fim de obter a menor concentração para o limite de detecção do método de amostragem, 10^2 UFC/cm².

Figura 2 – Etapas do preparo do inóculo de *L. monocytogenes*.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

4.5 PREPARO E INOCULAÇÃO DAS SALSICHAS

Duas embalagens de 5 kg de salsicha, do mesmo lote, foram descongeladas em geladeira ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) por aproximadamente 18 h. Após o descongelamento, as embalagens foram limpas externamente com álcool 70% e abertas dentro da cabine de segurança microbiológica, em condições assépticas. As amostras foram misturadas entre si manualmente para homogeneização em uma bacia de polipropileno, como apresentado na Figura 3 (a). As amostras selecionadas foram secas superficialmente com papel toalha estéril (Figura 3 (b)) e colocadas individualmente em sacos estéreis de amostragem (Figura 3 (c)). Amostras de salsichas foram separadas e armazenadas sob congelamento para posterior caracterização. As análises de pH e atividade de água (a_w) foram realizadas imediatamente. Todos os utensílios não autoclaváveis utilizados foram limpos com álcool 70% e expostos à luz UV durante 15 min antes da utilização.

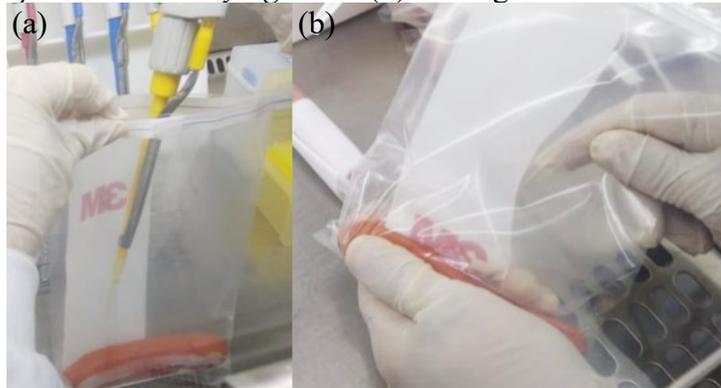
Figura 3 – (a) Homogeneização, (b) remoção de líquido superficial e (c) acondicionamento das amostras de salsicha.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

As amostras de salsicha foram inoculadas cuidadosamente dentro do saco estéril com 100 μ L do inóculo na concentração de 10^5 UFC/mL de *L. monocytogenes* e massageadas manualmente durante aproximadamente 10 s (Figura 4). O volume de inóculo utilizado para inoculação das amostras foi definido em ensaios prévios conforme ANEXO 2. Como controle, amostras de salsicha sem o inóculo foram separadas e identificadas para análise da presença ou ausência de *L. monocytogenes* e acompanhamento do crescimento de bactérias ácido lácticas (BAL) originalmente presentes no alimento. Os sacos de amostragem foram fechados, etiquetados e as amostras foram pesadas individualmente.

Figura 4 –(a) Inoculação da *L. monocytogenes* e (b) massagem das amostras de salsicha.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

4.6 CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para o início das cinéticas de crescimento as amostras foram colocadas em incubadoras tipo B.O.D, previamente estabilizadas na temperatura de utilização e monitoradas com auxílio de

Datalogger (Testo 174H). As amostras foram dispostas aleatoriamente nas prateleiras da incubadora para melhor distribuição da temperatura interna conforme apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Amostras de salsichas distribuídas em B.O.D.



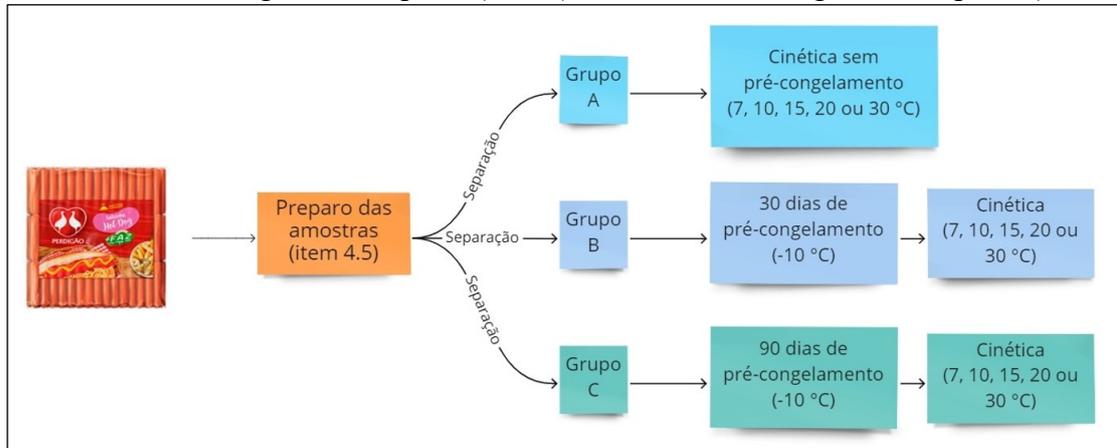
Fonte: elaborado pela autora (2022).

4.6.1 Incubação nas condições isotérmicas e congelamento prévio

As cinéticas de crescimento de *L. monocytogenes* em salsichas (*hot dog*) em condições isotérmicas, foram avaliadas em 5 temperaturas (7, 10, 15, 20 e 30 °C). O efeito do congelamento prévio a -10 °C foi avaliado mantendo as salsichas congeladas por 30 e 90 dias, e subsequente incubação nas mesmas 5 temperaturas das condições isotérmicas. Ao longo dos períodos de congelamento também foram realizadas amostragens para quantificação da bactéria durante a estocagem a -10 °C. Em cada período de amostragem foram realizadas contagens em duas amostras (duplicata) e cada cinética de crescimento foi repetida duas vezes.

Na Figura 6 está apresentado esquematicamente a separação das amostras em Grupos, correspondentes às condições de incubação.

Figura 6 - Etapas de separação de amostras nos Grupos A (sem congelamento prévio), B (com 30 dias de congelamento prévio) e C (com 90 dias de congelamento prévio).



Fonte: elaborado pela autora (2022).

As amostras foram divididas em 3 Grupos (A, B e C). No Grupo A, as amostras não passam por um período de congelamento e foram realizadas as cinéticas de crescimento nas 5 temperaturas logo após a inoculação das amostras. Enquanto os Grupos B e C foram acondicionados 30 e 90 dias a -10 °C, respectivamente, e, após descongeladas, foi medida a cinética de crescimento da bactéria nas mesmas 5 temperaturas. O tempo de início ($t = 0$) das cinéticas de crescimento para os Grupos B e C foi fixado no momento de término do período de congelamento, quando as amostras são transferidas para a B.O.D na temperatura de interesse para o crescimento.

O tempo para armazenamento foi definido em função do tempo de vida útil esperada para a salsicha utilizada. Noventa dias é o tempo limite de armazenamento em temperatura de congelamento para o consumo recomendado pelo fabricante. Enquanto 30 dias foi o tempo escolhido para comparação de resultados de possíveis diferenças na adaptação ao frio do microrganismo. A temperatura de congelamento de -10 °C foi definida a fim de simular a temperatura de um congelador doméstico.

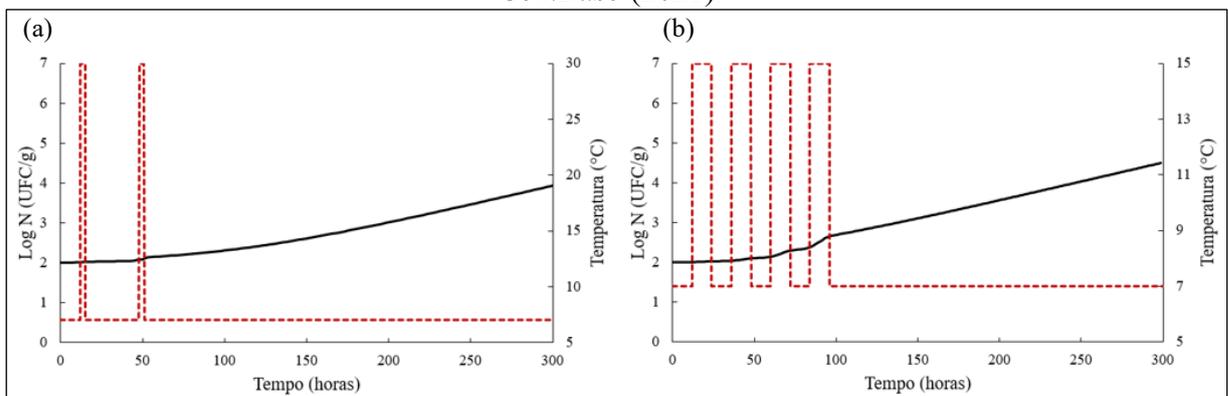
Aa variações das temperaturas nas cinéticas em condições isotérmicas (-10, 7, 10, 15, 20 e 30 °C) obtidas através de *Datalogger* (Testo 174H) estão apresentadas no ANEXO 3.

4.6.2 Incubação em condições não isotérmicas

As contagens do crescimento da bactéria em condições não isotérmicas foram realizadas para simular o efeito de abusos de temperatura em amostras incubadas sob

refrigeração. Dois cenários foram estudados. Condição não isotérmica 1 (Figura 7(a)) com o seguinte perfil de temperatura: manutenção da temperatura de refrigeração 7 °C e degrau de temperatura a 30 °C em 12 e 60 horas, durante 3 horas cada, a partir de 63 horas a temperatura de 7 °C é mantida até fase estacionária da curva de crescimento. Condição não isotérmica 2 (Figura 7(b)) com o seguinte perfil de temperatura: quatro períodos subsequentes a 7 °C e 15 °C durante 12 h cada, a partir de 96 horas a temperatura é mantida a 7 °C até a fase estacionária da curva de crescimento.

Figura 7 - Perfis de temperatura ao longo do tempo para a medida da cinética de crescimento da *L. monocytogenes* em condição com temperatura (a) 7 °C com perturbação degrau a 30 °C e (b) 7 °C com perturbação degrau a 15 °C. A linha vermelha representa o perfil de temperatura e a linha preta é a predição do crescimento microbiano obtida pela plataforma *ComBase* (2021).



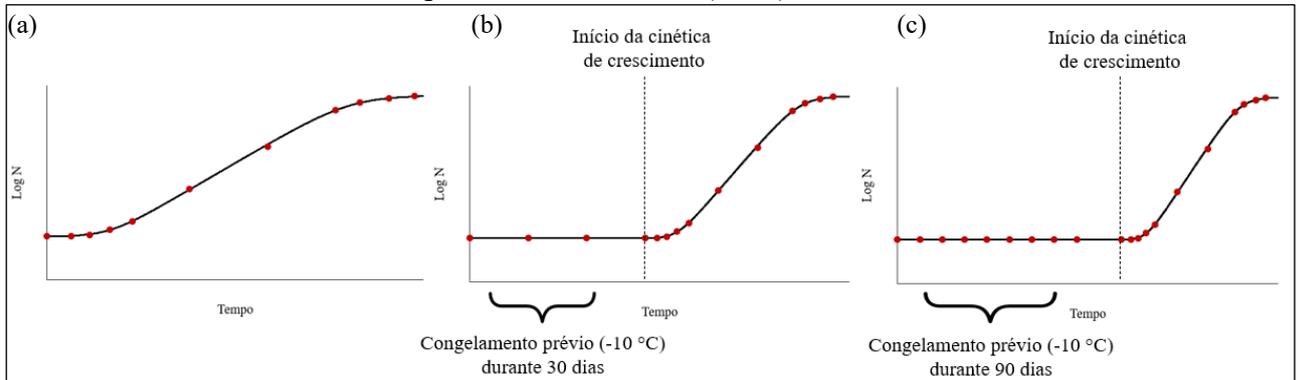
Fonte: elaborado pela autora (2022).

4.7 AMOSTRAGEM

4.7.1 Frequência de amostragem

Para cada cinética de crescimento microbiano em condição isotérmica, foram realizadas 11 amostragens em períodos estimados a partir da predição da plataforma *ComBase* (2021). Para a escolha dos tempos de amostragem, priorizou-se que o maior número de pontos estivesse localizado próximo ao final da fase lag e no início da fase estacionária. Essas duas áreas da curva de crescimento são importantes para descrever melhor o comportamento e para ajuste do modelo. Ao longo do período sob congelamento, foram feitas amostragens a cada 10 dias. A distribuição dos momentos de amostragem para cada condição de incubação (Grupo) está apresentada na Figura 8.

Figura 8 - Distribuição dos pontos de amostragem para os Grupos A(a), B(b) e C(c). Os pontos representam as amostragens e as linhas representam a predição realizada por meio da plataforma *ComBase* (2022).



Fonte: elaborado pela autora (2022).

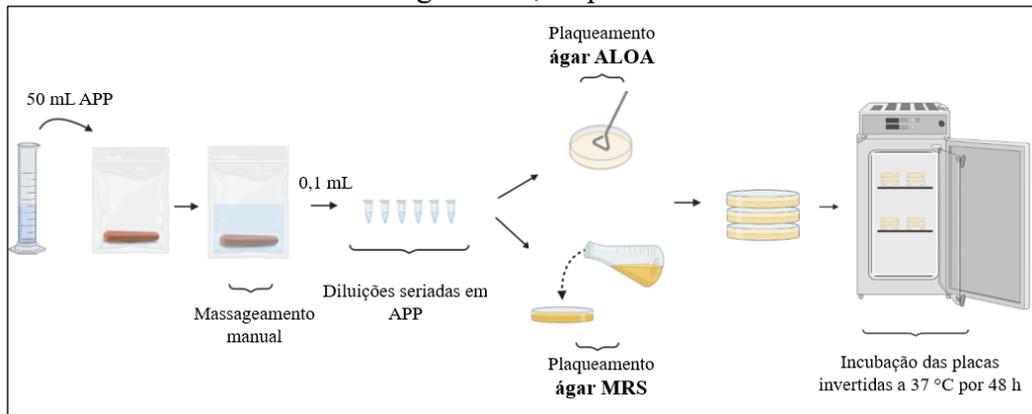
Nas cinéticas de crescimento em condições não-isotérmicas foram feitas aproximadamente 20 amostragens ao longo da curva de crescimento. Os tempos foram determinados a partir da predição da plataforma *ComBase* (2021). Nestas condições, priorizou-se a distribuição dos pontos no início da fase lag, início da fase estacionária e nos momentos próximos a variação de temperatura.

4.7.2 Enumeração de *L. monocytogenes*

Foram analisadas 2 salsichas contaminadas (duplicada) por ponto de amostragem e, em períodos intercalados de amostragem, uma salsicha sem contaminação (controle). A amostragem foi baseada no método de enumeração de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* pela técnica de contagem em superfície ISO 11290-2 (Figura 9). As amostras foram diluídas com 50 mL de água peptonada 0,1% no mesmo saco de amostragem que estavam acondicionadas e massageadas manualmente durante aproximadamente 10 s, obtendo-se a primeira diluição. O volume de água peptonada utilizado foi definido previamente, conforme descrito no ANEXO 2. Após, foram realizadas diluições seriadas em microtubos com 0,9 mL de água peptonada e 0,1 mL da diluição anterior. Em seguida, foi feito o plaqueamento em superfície em placa de Petri descartável e estéril com ágar ALOA e o espalhamento com alça de Drigalski estéril descartável. Para plaqueamentos da primeira diluição foi plaqueado 1 mL em placas de 140 mm, para os plaqueamentos das demais diluições o volume inoculado foi de 0,1 mL em placas de 90 mm. Para cada amostragem foram plaqueadas aproximadamente 5 diluições. As placas foram incubadas invertidas em B.O.D a 37 °C por 48 h, então, foram contadas as UFC.

As BAL foram quantificadas em pontos de amostragem intercalados, nos quais foram realizados plaqueamentos em profundidade em placas de 90 mm com ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960) (NEOGEN). Após a solidificação do ágar as placas foram incubadas invertidas em B.O.D a 37 °C por 48 h, então, foram contadas as UFC.

Figura 9 - Etapa de amostragem para enumeração de *L. monocytogenes* e BAL em ágar ALOA e ágar MRS, respectivamente.



Elaborado pelo autor.

Para o cálculo da concentração microbiana (N) a contagem de UFC foi multiplicada pelo inverso das diluições e dividida pela área da salsicha. Os resultados foram expressos em $\text{Log } N/N_0$.

4.8 MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO MICROBIANO

4.8.1 Modelagem primária

Para realizar a modelagem matemática, os dados experimentais foram organizados em função das temperaturas e condições de incubação e importados ao *software* R onde foram alocados em um armazenador de dados (*data frame*). O ajuste do modelo Baranyi e Roberts (Equações 6 e 10) aos dados experimentais foi realizado com o auxílio do pacote *biogrowth* (GARRE et al., 2021) do *software*. O pacote possui recursos para modelagem de crescimento populacional em condições estáticas e dinâmicas incluindo funções de ajuste de modelo e predição.

Para o ajuste do modelo aos dados experimentais das condições isotérmicas foi utilizada a função *fit_isothermal_growth* onde algumas dependências são requeridas, como: dados experimentais, modelo a ser utilizado, parâmetros conhecidos e chute inicial para os parâmetros a serem obtidos por regressão. O modelo utilizado foi o de Baranyi e Roberts, foi dado como conhecida a relação $\text{Log}(N/N_0)$ igual a 0 e os demais parâmetros (λ , $\mu_{\text{máx}}$ e $N_{\text{máx}}$) foram estimados. Após o ajuste do modelo aos dados experimentais, o *software* gera um banco de dados referente ao ajuste dos valores de concentração em função do tempo e parâmetros de crescimento primário.

4.8.2 Modelagem secundária

Foram utilizados os modelos secundários da Potência (Equação 15), Exponencial (Equação 14), Raiz Quadrada (Equação 11) e Arrhenius (Equação 12) para descrever a influência da temperatura nos parâmetros obtidos no ajuste primário.

4.8.3 Predição do crescimento não isotérmico

A predição do crescimento de *L. monocytogenes* em salsicha foi realizada utilizando o modelo de Baranyi e Roberts (na sua forma diferencial) juntamente com os modelos secundários no *software* R. O modelo foi escolhido pela sua ampla utilização e que, segundo Van Impe et al. (2005), é de fácil utilização, aplicável em situações com variações dinâmicas no ambiente, possui boa capacidade de ajuste e a maioria dos parâmetros obtidos são biologicamente interpretáveis.

Para a predição das condições não isotérmicas utilizou-se a função *predict_dynamic_growth* do pacote *biogrowth* que requer a entrada dos valores das condições ambientais ao longo do tempo (tempo vs. temperatura) além de parâmetros obtidos através do ajuste secundário.

Considerou-se a premissa dos autores do modelo, com h_0 constante para a mesma condição de incubação (Grupo). Admitindo que nas condições não isotérmicas analisadas as amostras não foram submetidas ao congelamento prévio, foi realizada a média dos valores de h_0 das temperaturas de crescimento do Grupo A. Após, foi realizado um novo ajuste para as condições isotérmicas a fim de se obter parâmetros de crescimento primário considerando h_0

constante. Com auxílio do *software* R gerou-se cada curva de crescimento com os valores preditos da concentração de *L. monocytogenes* ao longo do tempo.

4.8.4 Validação do modelo por análise estatística

Para a validação do desempenho da predição realizada pelo modelo foram utilizados os índices estatísticos: fator bias, fator de exatidão, RMSE e R^2 , Equações 19, 20, 21 e 22, respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA SALSICHA

Os resultados médios e respectivos desvios padrões para as análises físico-químicas de pH, atividade de água, concentrações de NaCl, área superficial e massa individual das salsichas utilizadas neste trabalho estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Média e desvio padrão das análises físico-químicas da salsicha.

Análise	Valor \pm DP
pH	6,36 \pm 0,02
Atividade de água	0,985 \pm 0,005
NaCl (% em massa)	2,64 \pm 0,09
Área superficial (cm ²)	98,8 \pm 0,17
Massa (g)	50 \pm 1

Fonte: elaborado pela autora (2022).

Os valores de pH, atividade de água e concentração de NaCl encontrados na literatura para salsicha são 5,96-6,10, 0,85-0,97 e 1,6-2,2%, respectivamente (AASLYNG; VESTERGAARD; KOCH, 2014; SANTOS et al., 2019; MARTINS et al., 2011; RODRIGUES et al., 2020), estando esses valores abaixo dos encontrados no presente trabalho.

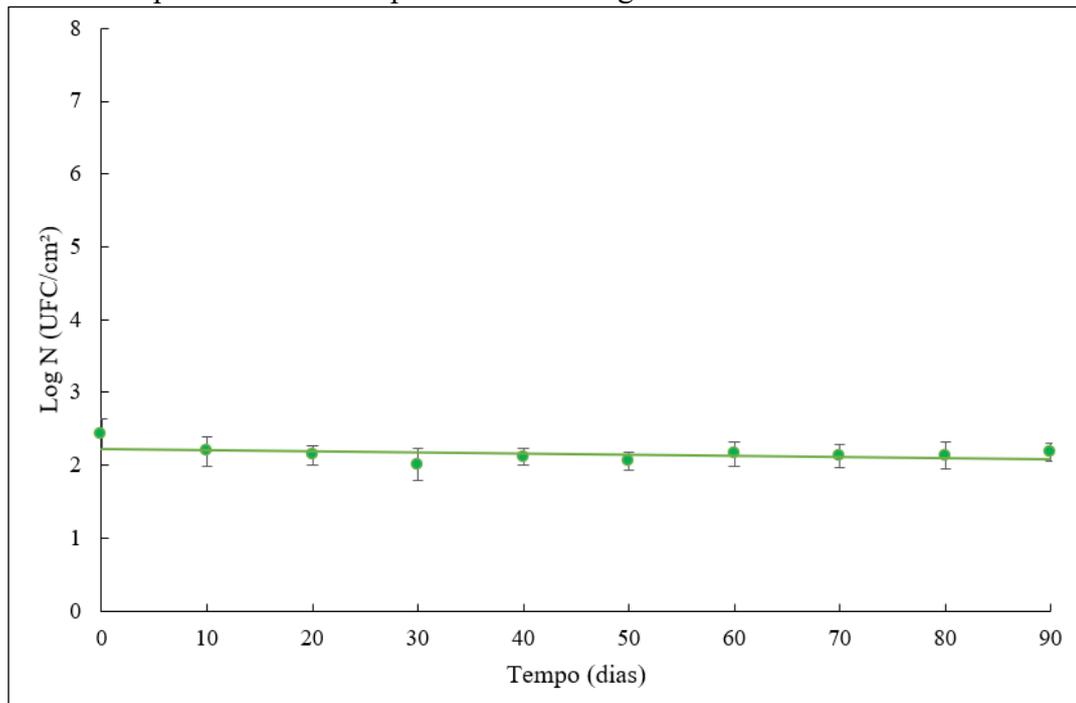
A bactéria *L. monocytogenes* é capaz de crescer em uma ampla faixa de pH de 4,5 a 9,2 porém a velocidade específica máxima de crescimento é observada em meios de crescimento com valores de pH próximos a 7. O valor de atividade de água deve ser $> 0,92$, em condições de temperatura e pH favoráveis, além disso a *Listeria* spp. cresce em concentrações de NaCl igual a 10% e sobrevive em superiores (RYSER; MARTH, 2007). Dessa forma, esse produto alimentício pode ser definido como meio de crescimento adequado ao desenvolvimento de *L. monocytogenes*.

5.2 CINÉTICAS DE CRESCIMENTOS DE *L. MONOCYTOGENES* EM SALSICHAS CONGELADAS

Na Figura 10 estão apresentados os resultados da contagem de *L. monocytogenes* em salsicha (*hot dog*) ao longo do tempo de vida útil do produto (90 dias) a -10 °C. Estes dados

foram obtidos durante os períodos de congelamento de 30 (Grupo B) e 90 dias (Grupo C), com amostras obtidas dos mesmos lotes. Os resultados referem-se a média das amostragens (realizadas em duplicata de amostras) obtidas para todos os períodos de congelamento.

Figura 10 – Contagem da bactéria *L. monocytogenes* em salsicha na temperatura de congelamento $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os pontos representam os dados experimentais, as barras o desvio padrão e a linha representativa da regressão linear aos dados.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

A *L. monocytogenes* não cresceu nas salsichas ao longo dos 90 dias. A concentração inicial foi de $2,43 \pm 0,21$ log UFC/cm² e, ao final dos 90 dias, o valor médio obtido foi $2,18 \pm 0,12$ log UFC/cm², representando a resistência das células de *L. monocytogenes* na temperatura de congelamento estudada como observado na predição da plataforma *Combase* (2022). As amostras controle (sem contaminação de *L. monocytogenes*) não apresentaram contagem do patógeno.

Os resultados do presente trabalho se assemelham aos encontrados por Taormina e Beuchat (2002), no qual os autores inocularam uma concentração de 2,0 log UFC/g de *L. monocytogenes* em superfícies de salsichas do tipo Frankfurt que foram estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 semanas. Segundo os autores não ocorreu mudança significativa na população e na viabilidade das células de *L. monocytogenes* na condição analisada.

Pradhan et al. (2012) também não observaram crescimento para *Listeria innocua* inoculada na concentração inicial de 4,5 log UFC/g em peito de frango estocado a 0, -12 e -20 °C pelos períodos de 10, 14 e 21 dias, respectivamente.

Porto, Call e Luchansky (2004) observaram que a concentração de 8,0 log UFC/56g de salsicha de *L. monocytogenes* em salsichas tipo Frankfurt embaladas a vácuo se mantiveram quando submetidas a estocagem a -18 °C pelo período de 30 dias.

Alguns trabalhos estenderam as pesquisas em tempos de estocagem de 6 e 10 meses em temperatura de congelamento de -20 °C. Ben Slama et al. (2013) estudaram a resistência de diferentes cepas de *L. monocytogenes* incubadas em fatias de queijo artesanal por 6 meses a -20 °C, com concentração inicial de 8 log UFC/g. Os autores comprovaram que, mesmo após 6 meses a -20 °C, a *L. monocytogenes* é capaz de expressar genes responsáveis pela sua virulência. A cepa isolada de carne congelada apresentou maior resistência ao frio, quando comparada a cepa utilizada como referência (ATCC 19115). Além disso, foi observada uma redução de até 2,58 log UFC/g ao final da análise, sendo que em 90 dias a redução foi de aproximadamente 2 log UFC/g.

Miladi et al. (2008) observaram a redução de 2,3 log UFC/g na concentração de células de *L. monocytogenes* (isoladas de carne) inoculadas em fatias de salmão durante 10 meses de estocagem a -20 °C. Os autores também concluíram que as cepas isoladas de carne foram mais resistentes ao processo de congelamento em comparação a cepa de referência (ATCC 19115) que apresentou redução na concentração do patógeno de 3,69 log UFC/g.

Palumbo e Willians (1991) discutem em seu trabalho a diferença das taxas de injúria nas células de *L. monocytogenes* expostas a temperaturas de congelamento quando inoculadas em meio de cultivo e alimentos. Matrizes alimentícias e suas composições (proteínas, carboidratos e triglicerídeos) podem, de alguma forma, proteger as células de *L. monocytogenes* e aumentar sua resistência ao estresse causado pelo frio. Além disso, fatores como viscosidade de alimento e porosidade também podem interferir no comportamento das células.

A resistência das células de *Listeria* spp. é um assunto amplamente discutido, em que é observado a resistência do patógeno em temperaturas de congelamento. O conhecimento do comportamento de *L. monocytogenes* em salsicha (*hot dog*) comprova, não apenas a continuidade da concentração de células ao longo do tempo na condição estudada, mas principalmente a presença do patógeno ao final da análise.

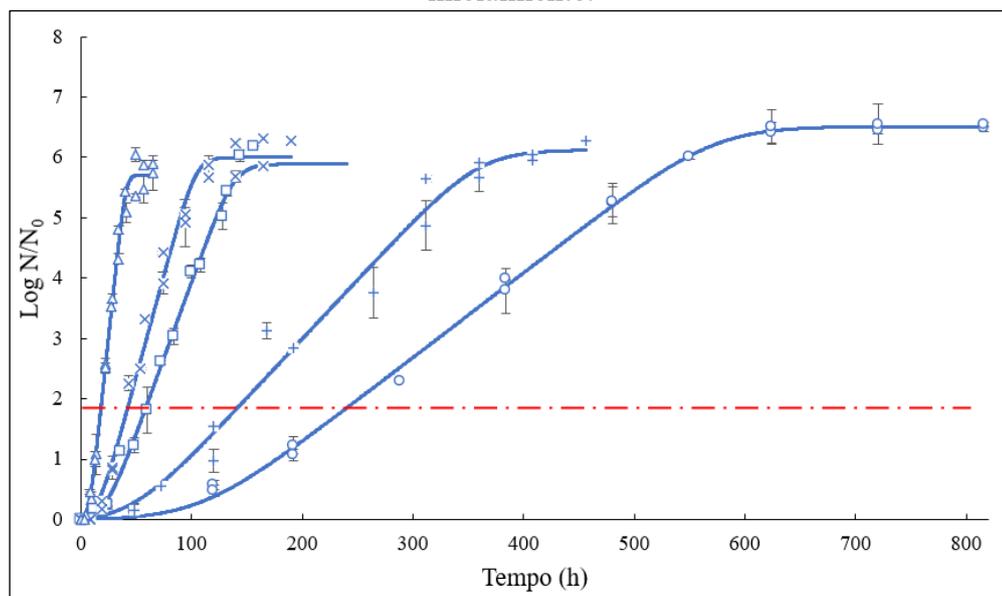
O resultado evidencia que, em relação a *L. monocytogenes*, é seguro armazenar as salsichas por 90 dias sob congelamento em temperaturas de -10 °C, como é sugerido na

embalagem pelo fabricante, pois não haverá crescimento do patógeno. Por outro lado, a presença do patógeno indica que é imprescindível o cuidado com práticas de armazenamento deste produto, pois mesmo após o congelamento por longos períodos as células se encontram presentes e podem apresentar riscos ao consumidor.

5.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *L. MONOCYTOGENES* EM SALSICHAS

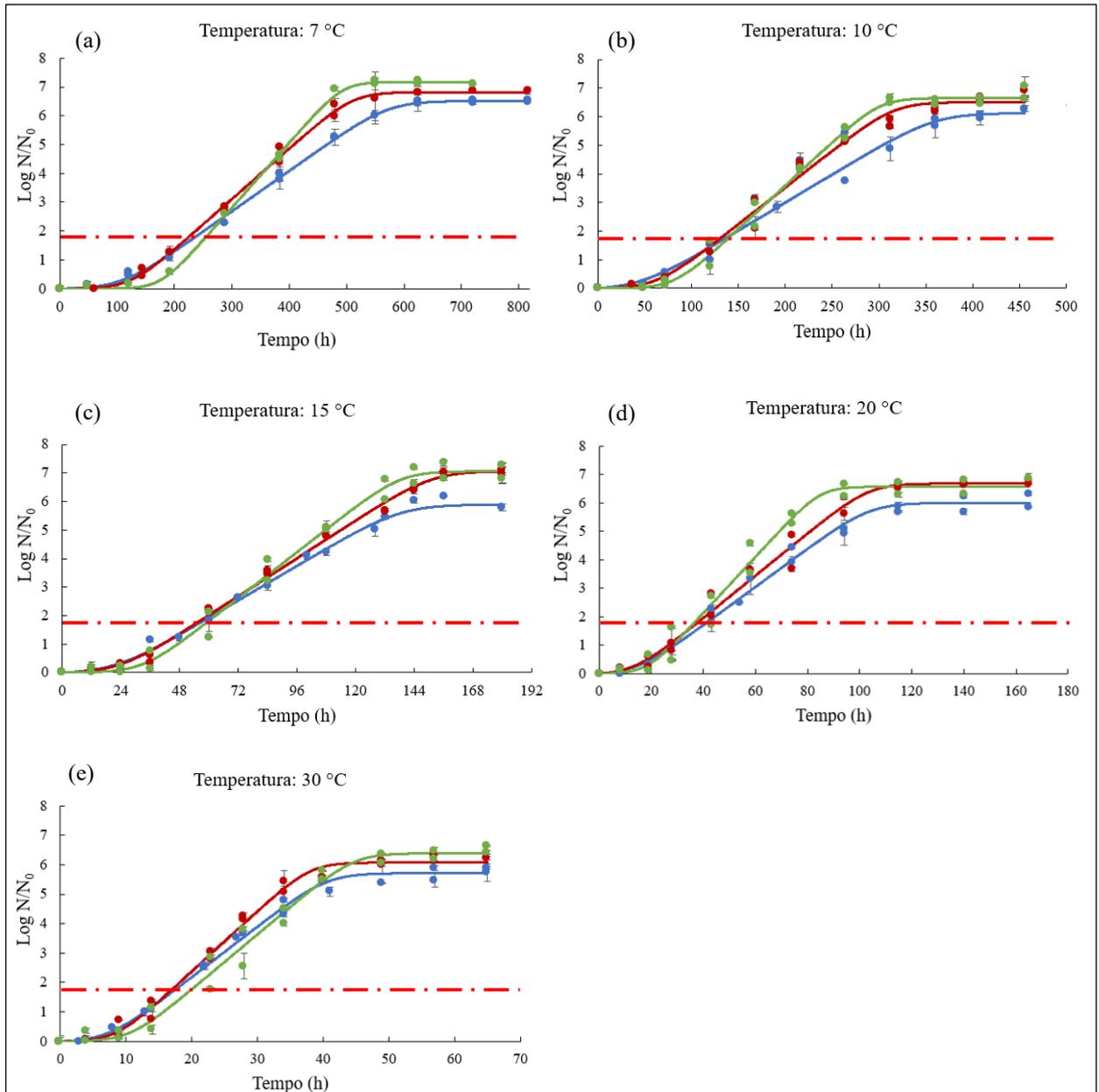
Os dados da cinética de crescimento de *L. monocytogenes* em salsicha armazenadas em temperaturas de refrigeração (7 e 10 °C) e abuso (15, 20 e 30 °C) estão apresentados na Figura 11 para o Grupo A (sem o congelamento prévio) possibilitando avaliação da influência da temperatura, e na Figura 12 para os três Grupos simultaneamente agrupados para cada temperatura para facilitar a análise da influência do período de congelamento prévio. Os parâmetros primários de crescimento obtidos com o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados e os índices estatísticos correspondentes estão apresentados nas Figuras 13, 14 e 15 e Tabela 2, respectivamente. Os valores dos parâmetros primários apresentados na forma de Tabela estão apresentados no ANEXO 5.

Figura 11 - Cinética de crescimento de *L. monocytogenes* em salsicha nas temperaturas de 7 (○), 10 (+), 15 (□), 20 (×) e 30 °C (Δ) sem congelamento prévio. As linhas azuis representam o ajuste do modelo Baranyi e Roberts aos dados experimentais, as barras são o desvio padrão e a linha tracejada vermelha é o limite estabelecido pela RDC 331/2019 (10^2 UFC/g = 50 UFC/cm² = 5000 UFC/salsicha) quando se assume 2 UFC/g de salsicha inicialmente.



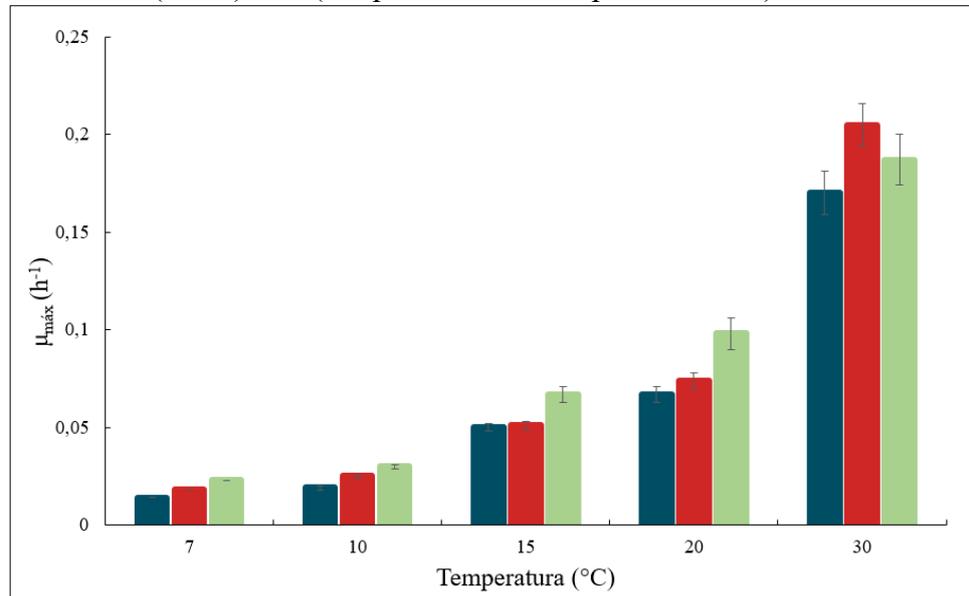
Fonte: elaborado pela autora (2022).

Figura 12 - Cinéticas de crescimento de *L. monocytogenes* em salsicha (*hot dog*) nas temperaturas de 7 (a), 10 (b), 15 (c), 20 (d) e 30 (e) °C sem (azul) e com congelamento prévio de 30 (vermelho) e 90 dias (verde) (Grupos A, B e C, respectivamente). Os pontos representam os dados experimentais, as linhas representam o ajuste do modelo Baranyi e Roberts, as barras são o desvio padrão e a linha tracejada vermelha é o limite RDC 331/2019 (10^2 UFC/g = 50 UFC/cm² = 5000 UFC/salsicha) quando se assume 2 UFC/g de salsicha inicialmente.



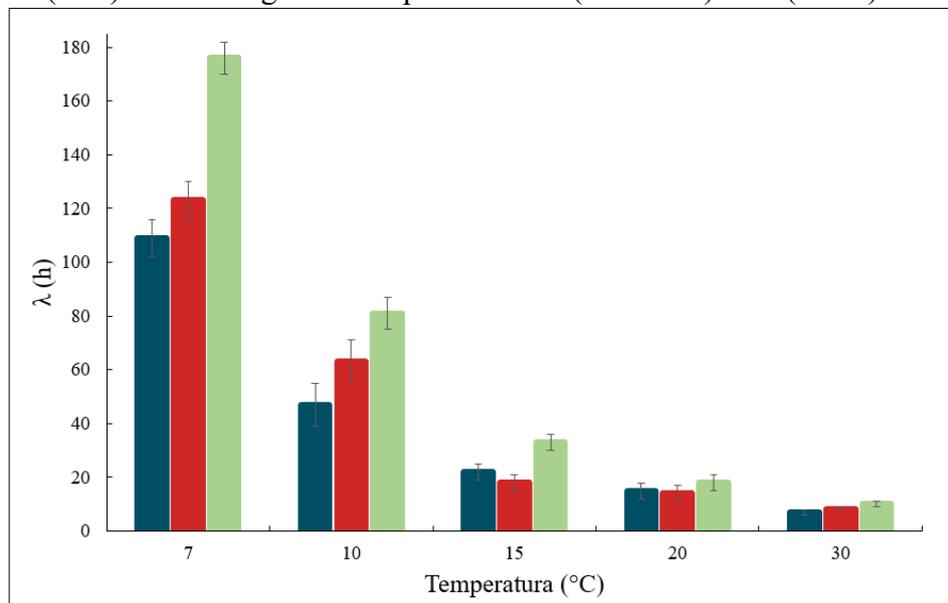
Fonte: elaborado pela autora (2022).

Figura 13 - Parâmetro de crescimento primário: velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) obtido pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C sem (azul) e com congelamento pr\u00e9vio de 30 (vermelho) e 90 (verde) dias (Grupos A, B e C, respectivamente).



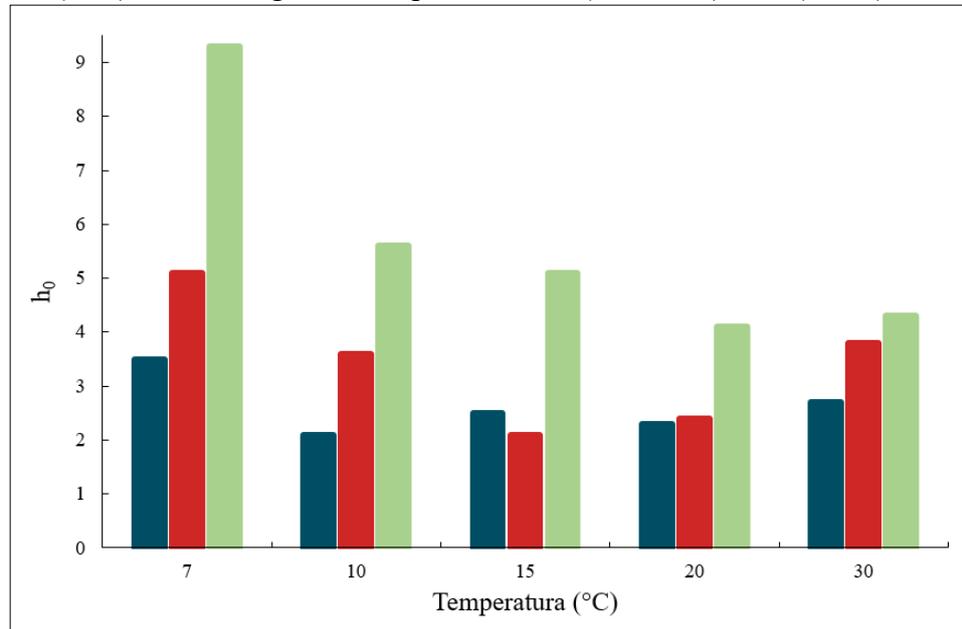
Fonte: elaborado pela autora (2022).

Figura 14 - Parâmetro de crescimento primário: tempo de fase lag (λ) obtido pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C sem (azul) e com congelamento pr\u00e9vio de 30 (vermelho) e 90 (verde) dias.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

Figura 15 - Parâmetro de crescimento primário: tempo de fase lag (h_0) obtido pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C sem (azul) e com congelamento prévio de 30 (vermelho) e 90 (verde) dias.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

Tabela 2 - Valores dos índices estatísticos para o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C sem e com congelamento prévio de 30 e 90 dias (Grupos A, B e C, respectivamente).

T (°C)	Condição de incubação (Grupo)	Bias	Exatidão	RMSE	R ²
7	A	1,14	1,17	0,090	0,999
	B	1,01	1,06	0,147	0,997
	C	1,85	1,87	0,106	0,999
10	A	0,94	1,14	0,303	0,984
	B	1,01	1,14	0,294	0,988
	C	1,01	1,16	0,238	0,993
15	A	1,02	1,16	0,273	0,986
	B	0,93	1,27	0,196	0,995
	C	1,06	1,54	0,286	0,991
20	A	0,94	1,13	0,245	0,989
	B	1,03	1,19	0,289	0,989
	C	1,12	1,45	0,351	0,984
30	A	1,03	1,07	0,185	0,994
	B	1,02	1,17	0,237	0,991
	C	1,18	1,43	0,329	0,984

Fonte: elaborado pela autora (2022).

Tabela 3 – Tempo necessário para as cinéticas de crescimento nas temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C sem e com congelamento prévio de 30 e 90 dias (Grupos A, B e C, respectivamente) atinjam o limite estabelecido pela RDC 331/2019 ($10^2\text{UFC/g} = 50\text{UFC/cm}^2 = 5000\text{UFC/salsicha}$) quando se assume 2 UFC/g de salsicha inicialmente.

T (°C)	Condição de incubação (Grupo)	Tempo	
		(h)	(dias)
7	A	230	9,6
	B	220	9,2
	C	250	10,4
10	A	134	5,6
	B	129	5,4
	C	137	5,7
15	A	55	2,3
	B	54	2,3
	C	58	2,4
20	A	40	1,7
	B	37	1,5
	C	36	1,5
30	A	17	0,7
	B	17	0,7
	C	19	0,8

Fonte: elaborado pela autora (2022).

Ao analisar a Figura 11, percebe-se que nas temperaturas estudadas todas as fases características do crescimento microbiano estão presentes (fase lag, exponencial e estacionária). Além das características da *L. monocytogenes* e das condições ambientais de crescimento proporcionarem este comportamento, a visualização das fases se dá como consequência do planejamento de distribuição dos tempos de amostragem e pelo desempenho de ajuste do modelo de Baranyi e Roberts.

É possível observar tendências de aumento e diminuição dos valores da velocidade específica máxima de crescimento (μ) e da fase lag (λ). Em condições de incubação com temperaturas mais próximas a ótima de crescimento para *L. monocytogenes*, 37 °C, o microrganismo apresenta um crescimento mais rápido e tempo de adaptação menor, como observado no presente trabalho. Por outro lado, à medida que a temperatura diminui o crescimento é mais lento e período de adaptação é maior.

Como apresentado na Equação 9, o parâmetro h_0 pode ser estimado a partir dos valores de μ e λ . Segundo Baranyi e Roberts (1994), o valor de h_0 representa o estado fisiológico das células no momento da incubação em um dado ambiente e pode ser considerado constante em

condições de meio de crescimento e inoculação iguais, ou seja, para as cinéticas de crescimento isotérmicas nas mesmas condições de incubação, mesmo que em temperaturas de refrigeração ou de abuso térmico, o valor de h_0 deveria ser o mesmo para todas as temperaturas analisadas.

Foi observado que para as cinéticas de crescimento do Grupo A, o h_0 ficou entre 2,1 e 3,5 (Figura 15). No crescimento a 7 °C, o estado fisiológico apresentou o maior valor, representando a maior diferença quando comparado as demais temperaturas. A média dos valores de h_0 de todas as temperaturas é $2,6 \pm 0,5$ enquanto sem a temperatura de 7 °C é de $2,4 \pm 0,3$. Mesmo que a *L. monocytogenes* tenha capacidade de crescer em temperaturas de refrigeração, isso implica na necessidade de adaptações fisiológicas maiores do que em condições de temperatura mais altas e que podem ser refletidas em valores de h_0 . A cinética de crescimento a 7 °C também resultou em maiores variações dos valores estatísticos para o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (Tabela 3).

O tempo necessário, em cada temperatura, para a concentração de células atingir o limite de concentração (10^2 UFC/g) estabelecido pela legislação RDC 331/2019 em conjunto com IN 60/2019 (linha tracejada vermelha), quando a concentração inicial é 2 UFC/g de salsicha, pode ser inferido pela Figura 11. Percebe-se que os tempos sob condições de refrigeração de 7 e 10 °C (9,6 e 5,6 dias, respectivamente) são relativamente bem maiores em comparação a temperaturas de abuso de 15, 20 e 30 °C (2,3, 1,7 e 0,7 dias, respectivamente). Mesmo com apenas 3 °C de diferença entre as duas temperaturas de refrigeração, o tempo foi diferente em 4 dias (96 h). Esta diferença demonstra como uma pequena variação de temperatura pode alterar o crescimento do patógeno no produto, além da importância da manutenção correta de temperatura ao longo do tempo de vida útil.

Nufer, Stephan e Tasara (2007) avaliaram o crescimento de *L. monocytogenes* inoculada em fatias de mortadela ($a_w = 0.96$) a 7 °C e observaram um aumento na concentração de células maior que 10^6 UFC/mL em 336 h e de 10^7 UFC/mL em 504 h de incubação. Esses resultados são maiores em comparação ao encontrado no presente trabalho, que foi de 10^6 UFC/cm² em 552 h de incubação, na mesma temperatura. Os autores compararam cepas isoladas de diferentes origens, e observaram que as cepas isoladas de plantas de processamento de carnes apresentaram maior velocidade específica máxima de crescimento, comparada às cepas isoladas de humanos. Segundo os autores, a melhor adaptação é devido ao histórico do ambiente ao qual as cepas foram isoladas, que pode ter contribuído para adaptações fisiológicas de crescimento a baixas temperaturas. Além disso, diferenças adaptativas são mais pronunciadas em temperaturas de refrigeração.

Como pode ser observado na Figura 12, mesmo após 90 dias de pré-congelamento a -10 °C, a contagem das células apresentou comportamento de crescimento similar entre os produtos congelados e não congelados. Ainda, observa-se, como esperado, a mesma tendência de aumento do parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ e diminuição do parâmetro λ em função do aumento da temperatura (Figuras 13 e 14). Para todas as condições de incubação (Grupos A, B e C), quando observadas separadamente, este comportamento se repete.

No entanto, quando comparados os 3 Grupos na mesma temperatura, é possível observar um aumento na velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) e na fase lag (λ) no crescimento da *L. monocytogenes* com o aumento do tempo de estocagem sob congelamento. Essa diferença é ainda maior para as temperaturas de refrigeração. Na temperatura de 7 °C a diferença foi maior comparado as outras temperaturas, o valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ obtido no Grupo C (com 90 dias de congelamento prévio) representa um aumento de 64,3% do valor observado no Grupo A (sem congelamento prévio).

Quanto ao tempo necessário para que as cinéticas de crescimento atinjam a concentração de 10² UFC/g estabelecida pela RDC 331/2019 e IN 60/2019 quando a concentração inicial é 2 UFC/g de salsicha (Tabela 3), os períodos de congelamento prévio não induziram diferenças na maioria das condições estudadas. Na temperatura de crescimento 7 °C as diferenças entre os tempos para os Grupos (A, B e C) são mais pronunciadas comparadas as demais temperaturas, porém não apresentam uma tendência de aumento. Nas demais temperaturas, como ambos os parâmetros, λ e $\mu_{m\acute{a}x}$ aumentaram, não provocou diferenças pronunciadas no tempo para atingir o limite.

Os índices estatísticos utilizados para avaliar o desempenho de ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais, apresentados na Tabela 2, permitem observar o bom desempenho do modelo escolhido ao representar os dados experimentais. Os valores obtidos para o fator Bias, exatidão e R² estão próximos a 1, na maioria dos resultados, enquanto os valores de RMSE próximos a zero.

Membré, Ross e McMeekin (1999) avaliaram condições de pré-incubação para o crescimento de *L. monocytogenes* em caldo. Os autores testaram duas condições de preparo de inóculo a 4 e 7 °C, durante 3 e 5 dias, respectivamente, com posterior incubação a 7 °C para determinação da cinética de crescimento. Foi observado que o preparo do inóculo a 4 °C aumentou a velocidade específica máxima de crescimento em comparação ao inóculo preparado a 7 °C, indicando que a pré-incubação a baixas temperaturas pode acarretar adaptações

fisiológicas que se pronunciam no aumento da velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo.

O estudo realizado por Dykes (2003) analisou os tempos de fase lag de cepas de *L. monocytogenes* quando pré-cultivadas em temperaturas de 4, 20 e 37 °C em meio de cultivo, e subsequente crescimento em mortadela na temperatura de 4 °C. Na mortadela, a pré-incubação do inóculo a 4 °C resultou em menor fase lag quando comparados aos inóculos pré-incubados nas temperaturas mais altas. Além disso, o autor conclui que os efeitos adaptativos são dependentes das cepas utilizadas. Cepas isoladas de plantas de processamento de carnes se mostraram mais resistentes por não apresentarem efeitos a condições de pré-incubação de 4 °C, enquanto cepas de origem clínica foram afetadas. Os autores explicam a diferença pela pré-disposição das cepas clínicas a ambientes de temperatura corporal (37 °C) enquanto as cepas originadas do ambiente podem ter históricos de variações de temperaturas maiores e consequentemente serem mais resistentes. E ressalta a importância da utilização de cepas com pré-disposição a adaptações para que resultados de avaliações de risco de produtos alimentícios não sejam subestimados.

Augustin et al. (2000) analisaram a influência de condições de estresse no cultivo prévio do inóculo de *L. monocytogenes* e concentrações iniciais no crescimento em caldo TSYE a 30 °C. A condição de estresse a qual as células foram submetidas foi uma fase estacionária tardia, onde ocorre a diminuição gradativa dos nutrientes do meio. Os autores observaram que tempos de fase lag aumentavam à medida que os tempos de estresse aumentavam e as concentrações iniciais diminuía. As diferenças mais significativas, resultando em aumento de tempo de fase lag, ocorreram com estresse de 840 h e concentração inicial 0,74 log UFC/mL para inóculos de *L. monocytogenes*.

Walker, Archer e Banks (1990) compararam duas condições de cultivo do inóculo de *L. monocytogenes*, isolada de *soft cheese*, 4 °C durante 6 dias e 30 °C durante 2 dias. Após, foi realizada cinética de crescimento em caldo de galinha (pH = 6,4) com estocagem em condições isotérmicas de -0,5 a 9,3 °C. Os autores observaram que o inóculo cultivado a 4 °C teve o tempo de fase lag reduzido em temperaturas de crescimento inferiores a 2 °C e no crescimento a 5 e 7,5 °C foi observado um aumento da velocidade específica máxima de crescimento. Os autores explicitam a importância do estudo de temperaturas baixas de pré-incubação, a fim de considerar a adaptação das células de *L. monocytogenes*, principalmente quando relacionados a tempos de vida útil de alimentos congelados ou refrigerados.

Em relação aos valores do parâmetro h_0 , apresentados na Figura 15, é possível observar que os valores obtidos nas temperaturas de refrigeração são maiores para as cinéticas de crescimento realizadas com congelamento prévio (Grupos B e C) do que quando não houve congelamento (Grupo A), sendo o efeito de 90 dias a $-10\text{ }^\circ\text{C}$ foi mais intenso. O aumento do h_0 foi de 46% (congelado por 30 dias) e 166% (congelado por 90 dias) para armazenagem a $7\text{ }^\circ\text{C}$ e de 71% (congelado por 30 dias) e 167% (congelado por 90 dias) em relação ao valor deste parâmetro quando não houve congelamento das amostras de salsicha. Por outro lado, para as maiores temperaturas, mudanças no valor de h_0 foram mais intensas apenas nas amostras congeladas por 90 dias (Grupo C), representando um aumento de 104%, 78% e 59% para as temperaturas de 15, 20 e $30\text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

Augustin, Rosso e Carlier (2000) e McKay et al. (1997) relataram que o aumento nos valores de h_0 ocorrem em cultivos após condições de pré-incubação que induzem estresses ao microrganismo por falta de nutrientes ou quando realizadas em meio sólido.

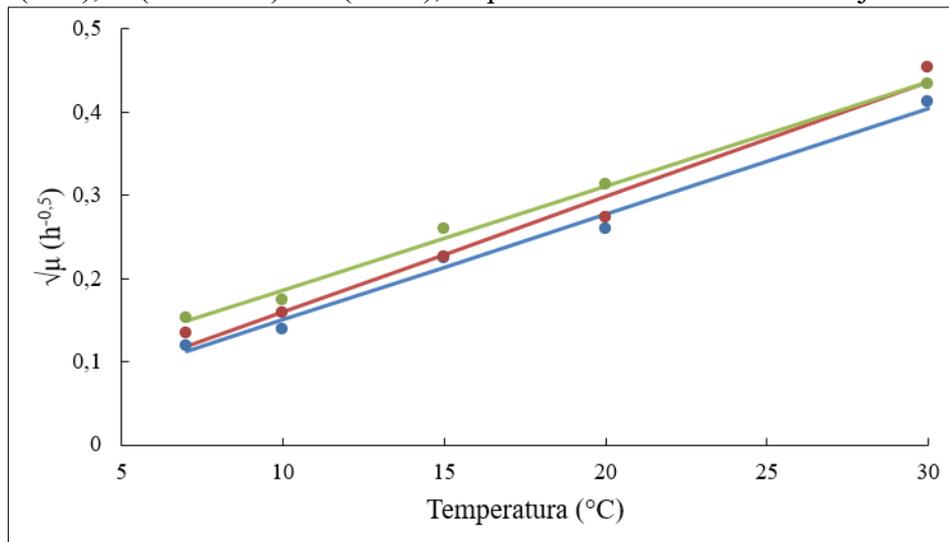
Taormina e Beuchat (2002) avaliaram o comportamento da *L. monocytogenes* em temperatura de congelamento com posterior refrigeração. Foi inoculado 2 log UFC/g de *L. monocytogenes* em salsichas do tipo Frankfurt e armazenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ em embalagem a vácuo durante 48 h. Após, foi removido o vácuo das embalagens e as salsichas foram incubadas a $12\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 dias. O período de congelamento prévio não alterou o comportamento de crescimento de *L. monocytogenes* a $12\text{ }^\circ\text{C}$ quando comparado ao sem congelamento prévio. Este resultado pode ser relacionado com o presente trabalho em relação ao tempo de congelamento prévio. Períodos de 30 e 90 dias em temperatura de congelamento foram suficientes para causar alterações perceptíveis nos parâmetros de crescimento da *L. monocytogenes*, e com 90 dias as alterações foram mais pronunciadas.

5.4 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

A construção dos modelos secundários foi feita a partir dos resultados obtidos para os parâmetros primários de crescimento, apresentados nas Figuras 13, 14 e 15. O modelo da Raiz Quadrada foi escolhido para descrever a influência da temperatura sobre parâmetro μ pois apresentou o melhor valor do coeficiente de correlação (R^2) entre os modelos testados, apresentados no ANEXO 4. O ajuste do modelo aos dados está apresentado na Figura 16 para as condições de temperatura estudadas sem e com períodos de congelamento prévio de 30 e 90 dias, Grupos A, B e C, respectivamente. As equações obtidas com o ajuste do modelo

matemático, bem como os índices estatísticos de avaliação do ajuste aos dados experimentais estão apresentados na Tabela 4.

Figura 16 – Ajuste do Modelo da Raiz Quadrada para o parâmetro μ . Os pontos representam os dados experimentais para as condições sem e com congelamento prévio de 30 e 90 dias, Grupos A (azul), B (vermelho) e C (verde), respectivamente e as linhas os ajustes do modelo.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

Tabela 4 - Modelo secundário da Raiz Quadrada para o parâmetro μ para cada condição de incubação sem e com congelamento prévio de 30 e 90 dias, Grupos A, B e C, respectivamente.

Condição de incubação (Grupo)	$\mu_{m\acute{a}x}$ ($h^{-0,5}$)	Bias	Exatidão	RMSE ($h^{-0,5}$)	R ²
A	$\sqrt{\mu} = 0,0127 \cdot (T + 1,8)$	0,99	1,12	0,006	0,989
B	$\sqrt{\mu} = 0,0138 \cdot (T + 1,6)$	1,02	1,12	0,010	0,980
C	$\sqrt{\mu} = 0,0125 \cdot (T + 4,9)$	1,00	1,06	0,004	0,997

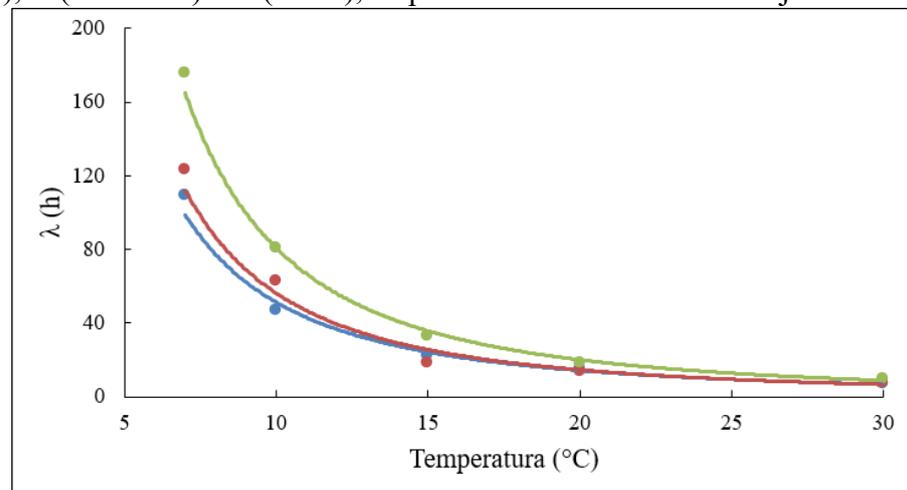
Fonte: elaborado pela autora (2022)

O modelo escolhido teve um bom ajuste aos dados experimentais representado pelos valores de bias, exatidão e R² próximos a 1 enquanto os valores do RMSE estão próximos a 0. Este comportamento foi observado independente da condição de incubação (Grupo) analisada. Conforme as equações apresentadas na Tabela 5, os parâmetros pelo modelo, b e T_{min} são: 0,023 e -1,8 °C para o Grupo A, 0,022 e -1,6 °C para o Grupo B e 0,061 e -4,9 °C para o Grupo C, respectivamente. O período de congelamento prévio de 90 dias influenciou no resultado do ajuste secundário nesta condição. É possível observar que o parâmetro b (coeficiente linear) para o Grupo C apresenta a maior diferença quando comparado aos Grupos A e B (Figura 13).

Kataoka et al. (2017) também utilizaram o modelo secundário da Raiz Quadrada para avaliar a dependência do parâmetro μ com as temperaturas de crescimento de *L. monocytogenes* inoculada em alimentos congelados (carne de caranguejo, milho, ervilha e camarão) e posteriormente descongelados em temperaturas de 4 a 20 °C. Os autores obtiveram valores de R^2 entre 0,9812 e 0,9945 representando um bom ajuste do modelo escolhido aos dados experimentais. Os valores obtidos para o parâmetro T_{min} ficaram entre -3,71 e -0,79 °C.

Utilizou-se o modelo da Potência para descrever a influência da temperatura sobre o parâmetro λ pois apresentou o melhor valor do coeficiente de correlação (R^2) entre os modelos testados, apresentados no ANEXO 4. O ajuste do modelo aos dados está apresentado na Figura 17 para as condições de temperatura estudadas sem e com períodos de congelamento prévio a 30 e 90 dias, Grupos A, B e C, respectivamente. As equações obtidas com o ajuste do modelo matemático, bem como os índices estatísticos de avaliação do ajuste aos dados experimentais estão apresentados na Tabela 5.

Figura 17 - Modelo secundário da Potência para o parâmetro λ . Os pontos representam os dados experimentais para as condições sem e com congelamento prévio de 30 e 90 dias, Grupos A (azul), B (vermelho) e C (verde), respectivamente e as linhas os ajustes do modelo.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

Tabela 5 - Modelo secundário da Potência para o parâmetro λ para cada condição de incubação sem e com congelamento prévio de 30 e 90 dias, Grupos A, B e C, respectivamente.

Condição de incubação (Grupo)	$\lambda(h)$	Bias	Exatidão	RMSE(h)	R^2
A	$\lambda = 3578,9 \cdot T^{-1,844}$	1,00	1,06	4,999	0,991
B	$\lambda = 4917,7 \cdot T^{-1,942}$	1,00	1,17	6,620	0,992
C	$\lambda = 8207,4 \cdot T^{-2,008}$	1,00	1,08	5,212	0,999

Fonte: elaborado pela autora (2022).

Os índices bias, exatidão e R^2 próximos a 1 comprovam o bom ajuste do modelo escolhido aos dados experimentais. Os resultados para índice RMSE apresenta valores altos em função, principalmente, dos resultados obtidos para a temperatura de 7 °C que parecem contribuir mais para o aumento do erro do ajuste.

Omac et al. (2015) realizou a modelagem de crescimento de *L. monocytogenes* em espinafre sob condições isotérmicas de 5 a 36 °C. O modelo primário utilizado foi o de Baranyi e Roberts enquanto os modelos secundários para os parâmetros μ e λ foram o modelo da raiz quadrada e modelo da potência, como no presente trabalho. Os autores encontraram bom ajuste de ambos os modelos secundários aos dados experimentais com valores de R^2 iguais a 0,99. No ajuste do modelo da raiz quadrada o parâmetro T_{min} encontrado foi de -4,26 °C e o termo exponencial encontrado no ajuste do modelo da potência foi de -1,77, valores similares aos encontrados no presente trabalho.

5.5 CONTAGEM DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS EM SALSICHAS

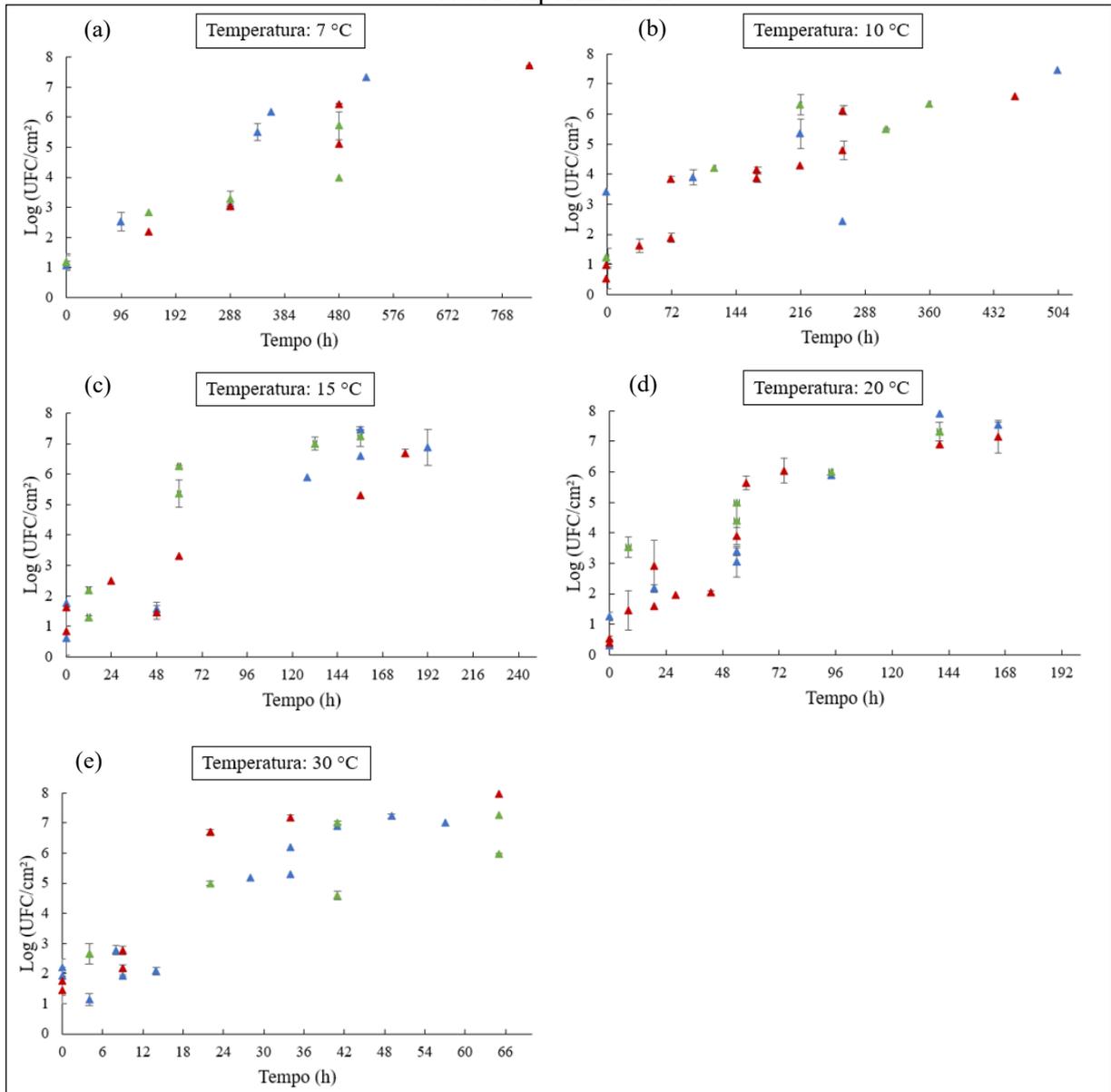
Os resultados obtidos para a contagem de Bactérias Ácido Láticas (BAL) em salsichas (*hot dog*) nas temperaturas de refrigeração (7 e 10°C) e abuso (15, 20 e 30 °C) sem e com períodos de congelamento prévio por 30 e 90 dias, Grupos A, B e C, respectivamente, estão apresentados na Figura 18.

A concentração inicial variou de 0,38 a 3,53 log UFC/cm², atingindo o máximo de 7,95 log UFC/cm² ao final do período de armazenamento. A variação na concentração inicial pode ser justificada devido as BAL quantificadas estarem originalmente presentes nas salsichas. A concentração inicial de BAL originalmente presente em salsichas cozidas varia de 2,06 a 4,9 log UFC/g conforme a literatura (BALAMURUGAN et al., 2018; RUIZ-CAPILLAS et al., 2016; SERGELIDIS et al., 2018). Além disso, o ágar (MRS) utilizado é recomendado para a contagem de BAL, porém não possui características diferenciais, o que pode resultar em maior variabilidade de resultados. As contagens acompanharam o crescimento de *L. monocytogenes* para todas as condições estudadas. Não foi possível identificar a influência do congelamento na contagem das BAL.

Considerando que as salsichas utilizadas neste trabalho estavam com a microbiota originalmente presente, não foram esterilizadas e não são pasteurizadas, são necessários mais

estudos para compreender o comportamento das BAL, com a utilização de métodos mais seletivos.

Figura 18 - Contagem de Bactérias Ácido Láticas em salsichas (*hot dog*) nas temperaturas de 7 (a), 10 (b), 15 (c), 20 (d) e 30 (e) °C sem (azul) e com congelamento prévio de 30 (vermelho) e 90 dias (verde) (Grupos A, B e C, respectivamente). Os pontos representam os dados experimentais.

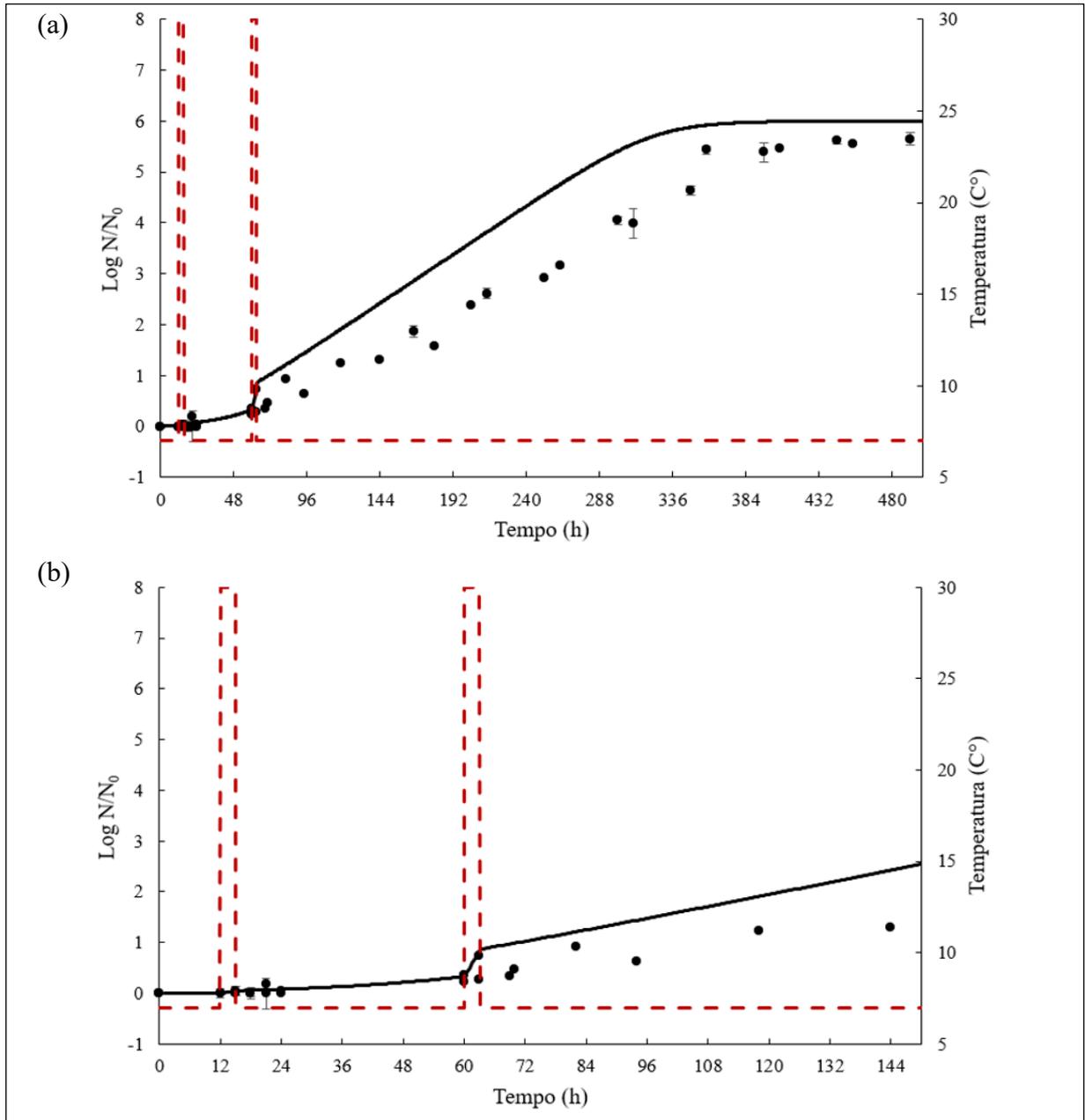


Fonte: elaborado pela autora (2022).

5.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PREDITIVA DO MODELO PARA CONDIÇÃO NÃO ISOTÉRMICA

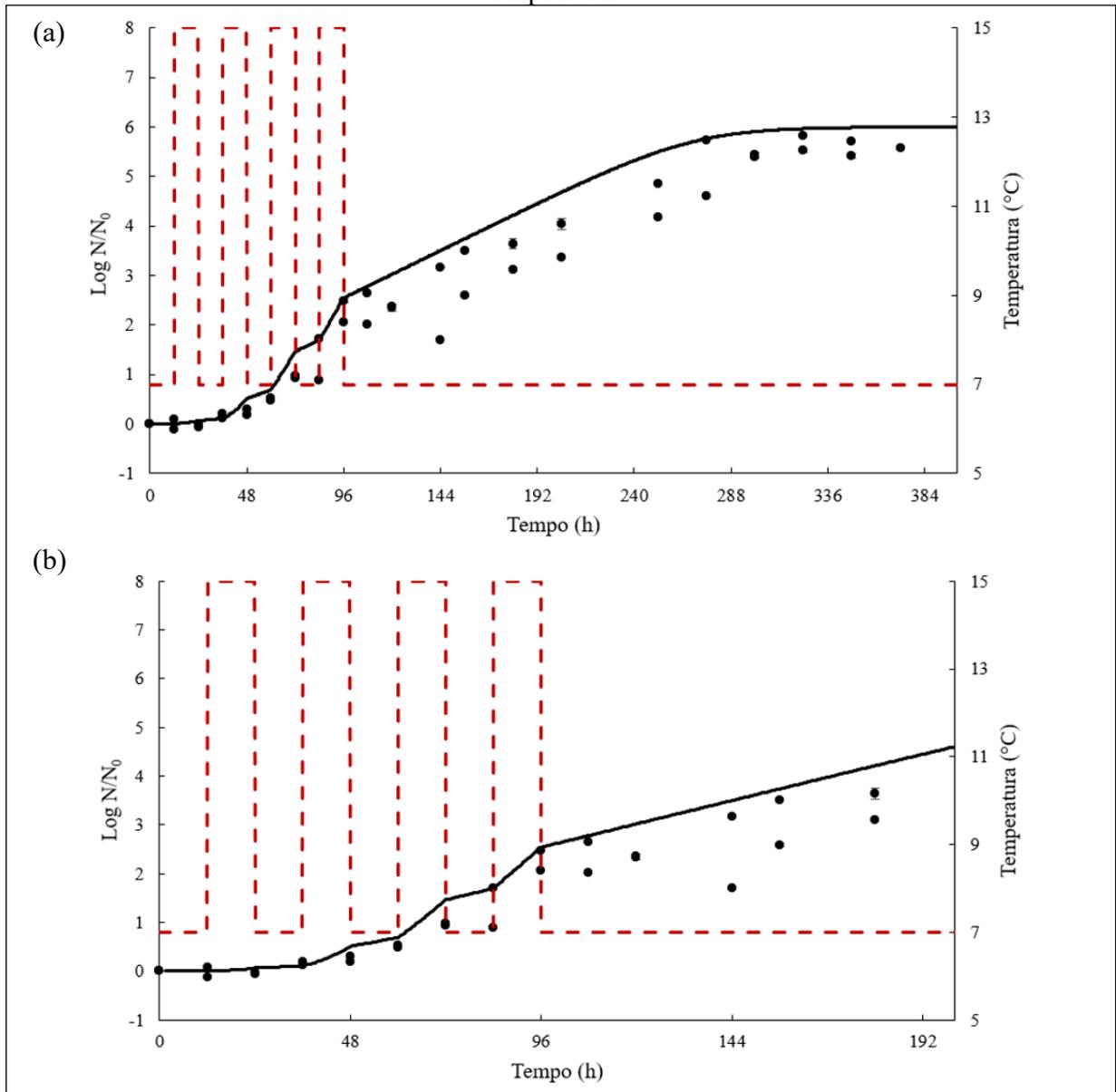
Nas Figuras 19 e 20 estão apresentadas as previsões do modelo matemático de Baranyi e Roberts para as condições não isotérmicas 1 e 2, respectivamente. Na condição não isotérmica 1, o perfil de temperatura foi constante a 7 °C com dois momentos de abuso de temperatura a 30 °C durante 3 horas cada. A condição não-isotérmica 2 foi realizada com o perfil de temperatura isotérmico a 7 °C com 4 períodos de abuso de temperatura a 15 °C durante 12 horas cada. Estes cenários visam simular abusos de temperatura que podem acontecer na manipulação incorreta do produto pelo consumidor ou varejista, em momentos como transporte, preparo ou armazenamento do alimento.

Figura 19 - Predição do modelo Baranyi e Roberts para a cinética de crescimento da *L. monocytogenes* em condição (1) com temperatura (a) 7 °C com perturbação degrau a 30 °C e (b) ampliação para visualização do degrau a 30 °C. Os pontos representam os dados experimentais, a linha representa o ajuste do modelo e a linha vermelha o perfil de temperatura.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

Figura 20 - Predição do modelo de Baranyi e Roberts para a cinética de crescimento da *L. monocytogenes* em condição (2) com temperatura (a) 7 °C com perturbação degrau a 15 °C e (b) ampliação para visualização do degrau a 15 °C. Os pontos representam os dados experimentais, a linha representa o ajuste do modelo e a linha vermelha o perfil de temperatura.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

Nas Figuras 19 e 20 observa-se que a predição do modelo acompanha a tendência dos dados experimentais principalmente na fase lag, para as duas condições estudadas.

Na Tabela 6 estão apresentados os valores dos índices estatísticos para a validação das predições realizadas pelo modelo de Baranyi e Roberts nas condições não isotérmicas 1 e 2. O fator bias (maior que 1) para as predições das condições não isotérmicas 1 e 2 indicam que, as predições são mais seguras em função do modelo ter uma tendência a superestimar os valores

dos dados experimentais. Por outro lado, o índice RMSE apresenta um valor alto, representando o erro das predições principalmente após os abusos de temperatura, onde as linhas das predições se encontram mais afastadas dos pontos experimentais. Os valores de R^2 representam a baixa proximidade das linhas de predição aos dados experimentais.

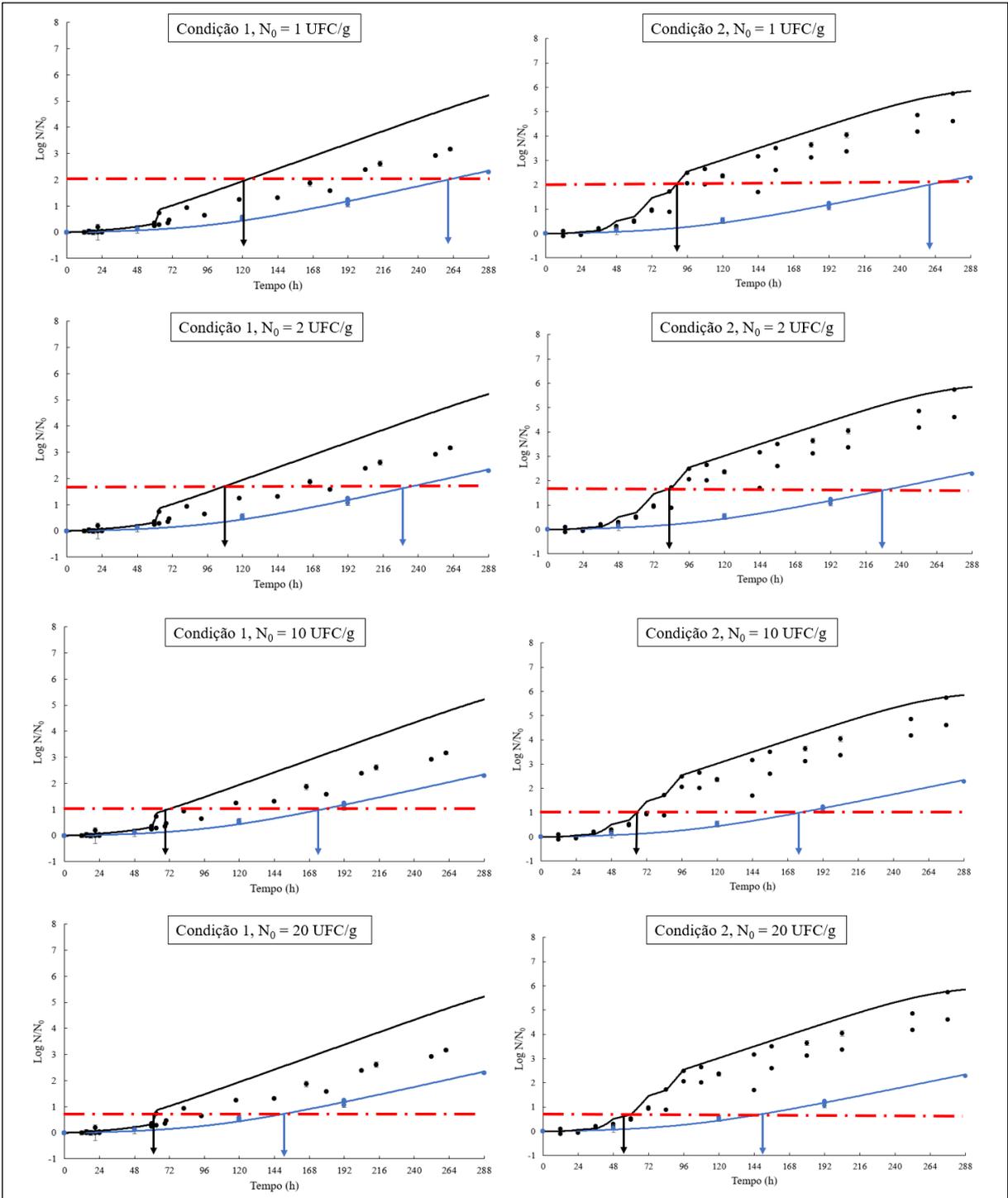
Tabela 6 - Valores dos índices estatísticos para a predição do modelo de Baranyi e Roberts para as condições com temperatura (1) 7 °C com perturbação degrau a 30 °C e (2) 7 °C com perturbação degrau a 15 °C.

Condição de incubação	Bias	Exatidão	RMSE	R²
1	1,35	1,45	0,831	0,920
2	1,12	1,34	0,643	0,941

Fonte: elaborado pela autora (2022).

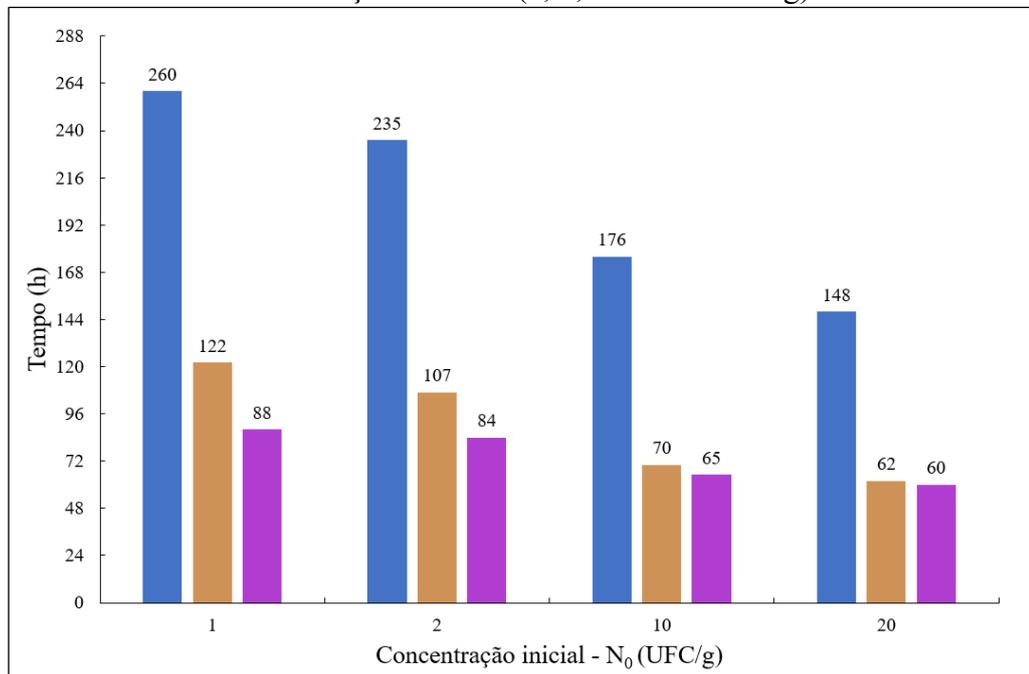
A obtenção de predições em condições não isotérmicas permite realizar a avaliação de risco de um alimento que pode vir a ser contaminado, acidentalmente, e posteriormente submetido a condições incorretas de manipulação e armazenamento. Segundo a RDC 331/2019 e IN 60/2019 o limite permitido de concentração de *L. monocytogenes* é de 10^2 UFC/g para 5 unidades amostrais de alimentos prontos para consumo. Desta forma, na Figura 21 estão apresentadas as predições do crescimento de *L. monocytogenes* em salsicha (*hot dog*) nas condições 1 e 2 e a cinética de crescimento em temperatura isotérmica a 7 °C, comparando o tempo para atingir o limite da legislação considerando diferentes concentrações iniciais de *L. monocytogenes* nas salsichas. Para complementar a análise, na Figura 22 estão os tempos necessários para que cada condição atinja a concentração de 10^2 UFC/g, dependendo na concentração inicial (N_0).

Figura 21 - Comparação dos tempos para atingir a concentração limite estabelecida pela RDC 331/2019 (10^2 UFC/g = 50 UFC/cm² = 5000 UFC/salsicha) nas predições das condições não isotérmicas 1 (lado direito) e 2 (lado esquerdo) e isotérmica 7 °C (azul). Os pontos representam os dados experimentais, as linhas as predições do modelo Baranyi e Roberts, a linha tracejada vermelha o limite de 10^2 UFC/g e o tempo para que o limite seja atingido a partir de diferentes concentrações iniciais está indicado pelas setas.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

Figura 22 - Comparação dos tempos obtidos para atingir a concentração limite estabelecida pela legislação RDC 331/2019 e IN 60:2019 nas predições das condições isotérmica 7 °C (azul), não isotérmica 1 (marrom) e não isotérmica 2 (roxo) a partir de diferentes concentrações iniciais (1, 2, 10 ou 20 UFC/g).



Fonte: elaborado pela autora (2022).

Comparando os resultados apresentados nas Figuras 21 e 22 entre as condições de incubação conclui-se que, as cinéticas de crescimento realizadas em condições não isotérmicas (1 e 2) simulando abusos de temperatura necessitam de tempos menores para que se atinja o limite de 10^2 UFC/g, quando comparadas a cinética de crescimento em condição isotérmica de 7 °C. Na simulação da menor concentração inicial de *L. monocytogenes*, $N_0 = 1$ UFC/g, o tempo para atingir o limite da legislação é de 2,1 vezes menor para a condição não isotérmica 1 (com abusos a 30 °C) do que a condição isotérmica a 7 °C, enquanto para a condição não isotérmica 2 (com abusos de 15 °C) esse tempo é 3 vezes menor. Este resultado explicita a importância da manutenção correta da cadeia do frio de alimentos prontos para consumo com alto risco de contaminação por *L. monocytogenes*. Além disso, quanto maior a concentração inicial do patógeno, menor será o tempo para atingir o limite da legislação.

Byelashov et al. (2008) realizaram cinéticas de crescimento de *L. monocytogenes* em salsichas Frankfurt em condições não isotérmicas para simular condições de abuso de temperatura. Uma das condições testadas foi de crescimento a 4 °C (24 h), 7 °C (7 h) e 12 °C (7 h), visando simular a variação de temperatura no transporte entre fábricas e lojas. Os autores observaram que o patógeno continuou na fase lag após a condição estudada, e justificam o

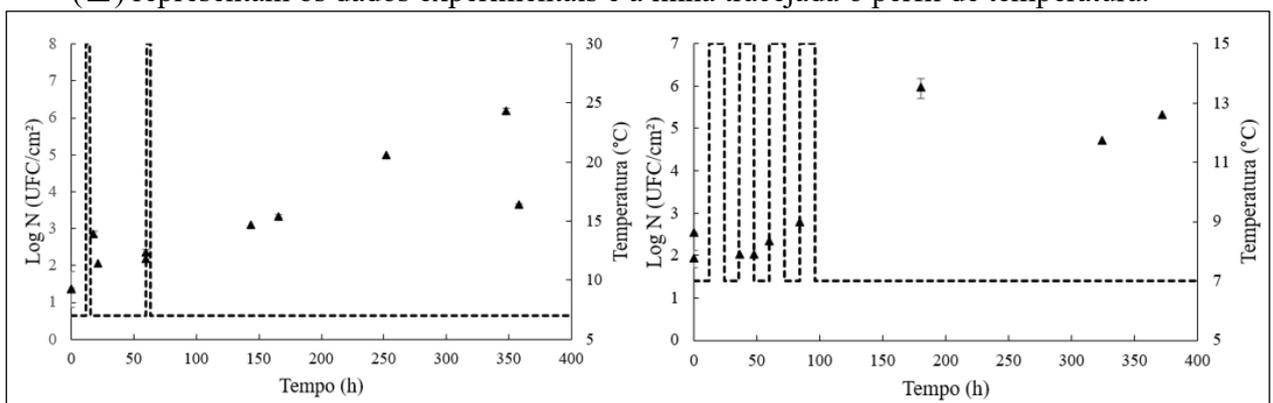
resultado pelo período muito curto entre a etapa de inoculação e o final da análise (38 h). No presente trabalho, na condição não isotérmica 2 de incubação, o aumento da população inicial ocorreu após 36 horas sob 7 °C (12 h), 15 °C (12 h) e 7 °C (12 h).

Os mesmos autores, Byelashov et al. (2008), repetiram as condições de incubação descritas e adicionaram um período de 3 h a 23 °C ao final da análise, a fim de simular o transporte do alimento de uma loja até o ambiente doméstico. O tempo e temperatura estabelecidos pelos autores não foi capaz de aumentar as concentrações do patógeno. Da mesma forma, no presente trabalho, o primeiro período de abuso de temperatura a 30 °C durante 3 h na condição não isotérmica 1 resultou em um aumento da concentração de *L. monocytogenes* menor que 0,04 log UFC/cm², obtendo maior crescimento a partir do segundo período de abuso de temperatura a 30 °C por 3 h de 0,73 log UFC/cm².

5.6.1 Contagem de Bactérias Ácido Láticas em salsichas nas condições não isotérmicas

Na Figura 20 estão apresentados os resultados de contagens de BAL em salsichas (*hot dog*) inoculadas com *L. monocytogenes* ao longo do tempo nas condições não isotérmicas 1 e 2. Conforme apresentado, as contagens de BAL não apresentam um padrão de crescimento ao longo do tempo em ambas as condições estudadas.

Figura 23 - Contagem de BAL para as condições não-isotérmicas 1 (a) e 2 (b). Os símbolos (▲) representam os dados experimentais e a linha tracejada o perfil de temperatura.



Elaborado pelo autor.

6 CONCLUSÕES

A bactéria *L. monocytogenes* inoculada em salsichas tipo *hot dog* cresceu em todas as condições de temperaturas (7, 10, 15, 20 e 30 °C) sem e com períodos prévios de congelamento por 30 e 90 dias a -10 °C.

Durante o período de congelamento a -10 °C por até 90 dias (tempo de vida útil do produto conforme o fabricante) a concentração da *L. monocytogenes* permaneceu na mesma ordem de grandeza, demonstrando a resistência das células ao frio. Este comportamento vai de encontro ao que é sugerido pelo fabricante na embalagem do produto, de armazenamento até 90 dias em temperaturas de -12 °C ou inferiores.

Os períodos de congelamento prévio de 30 e 90 dias a -10 °C induziram diferenças adaptativas nos crescimentos de *L. monocytogenes* em salsicha nas condições estudadas. O parâmetro h_0 , que descreve o estado fisiológico das células, se destacou em função da diferença nos valores do Grupo A (sem congelamento prévio) para o Grupo C (com 90 dias de congelamento prévio), para cada temperatura, quando analisadas separadamente. Este resultado sugere que o metabolismo das células foi afetado pelos períodos de estresse ao frio ao qual foram submetidas colaborando para a importância de períodos de pré-incubação em baixas temperaturas. Baixas temperaturas de pré-incubação visam simular cenários reais, considerando a capacidade adaptativa da bactéria *L. monocytogenes*.

Os parâmetros de crescimento primário μ e λ aumentaram à medida que os períodos de congelamento prévio também, para a mesma temperatura de crescimento. Diferenças mais pronunciadas foram observadas entre parâmetros do Grupo A e Grupo C.

Os modelos secundários utilizados para descrever a dependência dos parâmetros primários μ e λ com a temperatura foram o Modelo da Raiz Quadrada e o Modelo da Potência, respectivamente. Os modelos secundários escolhidos obtiveram bons resultados de ajuste, como demonstra a análise dos índices estatísticos.

Valores de exatidão e RMSE altos, na predição de condições não isotérmicas, estão relacionados principalmente a dificuldade do modelo em descrever a fase estacionária de crescimento, região onde os dados experimentais parecem menos próximos a predição do modelo.

A predição do modelo de Baranyi e Roberts nas condições não isotérmicas de crescimento foram satisfatórias e permitiram a avaliação de risco de diferentes cenários de abusos de temperatura importantes para a segurança do alimento. As condições não isotérmicas

analisadas apresentam tempos para atingir o limite estabelecido pela legislação RDC 331/2019 e IN 60/2019 (10^2 UFC/g) menores em relação a cinética de crescimento isotérmico a 7 °C, temperatura de refrigeração indicada para armazenamento pelo fabricante, para diferentes concentrações iniciais.

Modelos matemáticos que possibilitam a obtenção parâmetros de crescimento de microrganismos patógenos em alimentos são de grande importância para indústrias de alimentos prontos para consumo. A simulação de cenários que comprometem a segurança do alimento a partir de predições torna a análise de risco mais rápida e efetiva, contribuindo para o aumento de vida útil desses alimentos.

REFERÊNCIAS

AASLYNG, M. D.; VESTERGAARD, C.; KOCH, A. G. The effect of salt reduction on sensory quality and microbial growth in hotdog sausages, bacon, ham and salami. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 47–55, 1 jan. 2014.

ALIÑO, M. et al. Development of a low-sodium ready-to-eat desalted cod. **Journal of Food Engineering**, v. 107, n. 3–4, p. 304–310, 1 dez. 2011.

ANDRADE, R. R. DE et al. Ocorrência e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. em salsichas tipo hot dog a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 147–152, 2014.

AUGUSTIN, J. C. et al. Significance of Inoculum Size in the Lag Time of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1706, abr. 2000.

AUGUSTIN, J. C.; ROSSO, L.; CARLIER, V. A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 169–181, 15 jun. 2000.

AZIZ, S. **Food recalls over Listeria concerns are on the rise in Canada. Here's what you should know - National | Globalnews.ca.** Disponível em: <<https://globalnews.ca/news/8160666/listeria-contamination-food-recall-canada/>>. Acesso em: 25 jan. 2022.

BALAMURUGAN, S. et al. Effects of High Pressure Processing and Hot Water Pasteurization of Cooked Sausages on Inactivation of Inoculated *Listeria monocytogenes*, Natural Populations of Lactic Acid Bacteria, *Pseudomonas* spp., and Coliforms and Their Recovery during Storage at 4 and 10°C. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 8, p. 1245–1251, 1 ago. 2018.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3–4, p. 277–294, 1 nov. 1994.

BARRIA, C.; MALECKI, M.; ARRAIANO, C. M. Bacterial adaptation to cold. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. PART 12, p. 2437–2443, 1 dez. 2013.

BEN SLAMA, R. et al. Survival of *Listeria monocytogenes* cells and the effect of extended frozen storage (-20 °C) on the expression of its virulence gene. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 5, p. 1174–1183, 7 jul. 2013.

BERNAERTS, K. et al. Modeling Microbial Responses in Food . In: **Modeling Microbial Responses in Food**. Washington, D.C.: CRC Press, p. 255-273, 2004.

BRASIL. Ministério da saúde. **Boletim Epidemiológico Especial**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/>>. Acesso em: 1 abr. 2022.

Brasil. **IBGE - LADEM - Laboratório de Demografia e Estudos Populacionais -Envelhecimento populacional continua e não há perigo de um geronticídio.** Disponível em: <<https://www.ufjf.br/ladem/2020/60/21/envelhecimento-populacional-continua-e-nao-ha-perigo-de-um-geronticidio-artigo-de-jose-eustaquio-diniz-alves/>>. Acesso em: 17 dez. 2021.

BRASIL. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos de Origem Animal - Carneos e seus derivados.** Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/suasa/regulamentos-tecnicos-de-identidade-e-qualidade-de-produtos-de-origem-animal-1/rtiq-carneos-e-seus->

derivados-1>. Acesso em: 15 jan. 2022.

BUCHANAN, R. L. et al. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, v. 75, p. 1–13, 1 maio 2017.

BYELASHOV, O. A. et al. Evaluation of Changes in *Listeria monocytogenes* Populations on Frankfurters at Different Stages from Manufacturing to Consumption. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. M430–M437, 1 nov. 2008.

CAC. Codex Alimentarius Commission. **Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**. CAC/GL 61-2007. Roma: Codex Alimentarius Commission, FAO, 2009.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/map.html>>.

Acesso em: 5 dez. 2021.

CDC. **Listeria** (Listeriosis). Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/index.html>>. Acesso em: 14 fev. 2022.

ComBase. Disponível em: <<https://browser.combase.cc/>>. Acesso em: 4 mar. 2022.

CORDERO, N. et al. Different Transcriptional Responses from Slow and Fast Growth Rate Strains of *Listeria monocytogenes* Adapted to Low Temperature. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAR, 1 mar. 2016.

CULLEN, A. C.; FREY, H. C. **Probabilistic Techniques in Exposure Assessment**. v. 1, New York: Springer, 1999.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. v. 4, Porto Alegre: Grupo A - Artmed, 2000.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130–135, 1 abr. 1960.

DESAI, A. N. et al. Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: A review of ProMED reports from 1996 to 2018. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 84, p. 48–53, 1 jul. 2019.

DYKES, G. A. Behaviour of *Listeria monocytogenes* on two processed meat products as influenced by temperature or attached growth during preincubation. **Food Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 91–96, 1 fev. 2003.

DZIECIOL, M. et al. Bacterial diversity of floor drain biofilms and drain waters in a *Listeria monocytogenes* contaminated food processing environment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 223, p. 33–40, 16 abr. 2016.

ESHWAR, A. K. et al. Cold-Shock Domain Family Proteins (Csps) Are Involved in Regulation of Virulence, Cellular Aggregation, and Flagella-Based Motility in *Listeria monocytogenes*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, n. OCT, 26 out. 2017.

EFSA. European Food Safety Authority. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, v. 17, n. 12, 1 dez. 2019.

EVANS, E. W.; REDMOND, E. C. Analysis of older adults' domestic kitchen storage practices in the United Kingdom: Identification of risk factors associated with listeriosis. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 4, p. 738–745, 2015.

FAO. **Related Standards | Codex Alimentarius FAO-WHO**. Disponível em: <<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/committees/committee/related->

standards/en/?committee=CCFH>. Acesso em: 15 jan. 2022.

FSIS. **Target Corporation Recalls Frozen Ready-To-Eat and Non-Ready-To-Eat Meat and Poultry Products due to Possible Temperature Abuse During Transport at a Single Store on Oahu.** Disponível em: <<https://www.fsis.usda.gov/recalls-alerts/target-corporation-recalls-frozen-ready-eat-and-non-ready-eat-meat-and-poultry>>. Acesso em: 25 jan. 2022.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas.** 4 ed. São Paulo: Artmed, 2019. p. 1-944.

FRANCOIS, K. et al. Effect of preincubation temperature and pH on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes*, cultured at refrigeration temperatures. **Food microbiology**, v. 24, n. 1, p. 32–43, fev. 2007.

GARCIA-SANTOS, M. DE S. L. et al. Effect of the addition of resistant starch in sausage with fat reduction on the physicochemical and sensory properties. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 491–497, 27 maio 2019.

GARRE, A. et al. Package “biogrowth” Title Modelling of Population Growth. 23 ago. 2021.

GLENN MORRIS, J.; E. POTTER, M. **Foodborne Infections and Intoxications Fourth Edition.** 4. ed. USA: Elsevier, 2013.

HENRIQUES, A. R.; FRAQUEZA, M. J. Biofilm-forming ability and biocide susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the ready-to-eat meat-based food products food chain. **Food Science and Technology**, v. 81, p. 180–187, 1 ago. 2017.

HONG, Y. K. et al. Predictive modeling for growth of non- and cold-adapted *Listeria monocytogenes* on fresh-cut cantaloupe at different storage temperatures. **Journal of food science**, v. 79, n. 6, 2014.

Brasil. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 60, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019.** Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>>. Acesso em: 25 mar. 2022.

KADAM, S. R. et al. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 3, p. 259–264, 1 ago. 2013.

KALLIPOLITIS, B.; GAHAN, C. G.; PIVETEAU, P. Factors contributing to *Listeria monocytogenes* transmission and impact on food safety. **Current Opinion in Food Science**, v. 36, p. 9–17, 1 dez. 2020.

KATAOKA, A. et al. Growth of *Listeria monocytogenes* in Thawed Frozen Foods. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 3, p. 447–453, 1 mar. 2017.

KURPAS, M.; WIECZOREK, K.; OSEK, J. Ready-to-eat Meat Products As a Source of *Listeria Monocytogenes*. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 1, p. 49, 1 mar. 2018.

LIMA MARTINS, L. et al. Determinação de pH e atividade de água (Aa) e sua inter-relação com o perfil bacteriológico de salsichas tipo “hot dog” comercializadas nos municípios do Rio de Janeiro e Niterói – RJ. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, p. 92–96, dez. 2011.

LIRA, A. L. et al. Uso da Microbiologia Preditiva na Segurança Alimentar de Produtos / Cárneos Use of Predictive Microbiology in Food Safety of Meat Product. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 104223–104237, 2020.

LONGHI, D. A. et al. Microbial growth models: A general mathematical approach to obtain μ_{max} and λ parameters from sigmoidal empirical primary models.

Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 34, n. 2, p. 369–375, 1 abr. 2017.

LONGHI, D. A.; FALCÃO DE ARAGÃO, M.; AUGUSTO MATTAR CARCIOFI, B. **Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas**. Florianópolis: Florianópolis, 2012.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Brasil - **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 9, 2009**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controlado-de-patogenos/listeria-monocytogenes>>. Acesso em: 17 dez. 2021.

MCKAY, A. et al. Determining specific growth rates in different regions of *Salmonella typhimurium* colonies. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 74–76, 1 jan. 1997.

MCMEEKIN, T. A. et al. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 2–3, p. 395–407, 11 mar. 2002.

MEMBRÉ, J. M.; ROSS, T.; MCMEEKIN, T. Behaviour of *Listeria monocytogenes* under combined chilling processes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 216–220, 1 mar. 1999.

MERCIER, S. et al. Time–Temperature Management Along the Food Cold Chain: A Review of Recent Developments. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 4, p. 647–667, 1 jul. 2017.

MILADI, H. et al. Freezing effects on survival of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cold fresh-salmon. **Annals of Microbiology** 2008 58:3, v. 58, n. 3, p. 471–476, 2008.

NARIMATSU PETTINATI, N.; TELLES OLIVEIRA, E.; CARVALHO BALLIAN, S. *Listeria monocytogenes* in hot dog sausages obtained from groceries stores in the city of São Paulo: A comparative and retrospective analysis of human isolates. **Veterinária e Zootecnia**, v. 13, n. 2, p. 182–191, 2006.

NICD. **Source of Listeria Outbreak Identified - NICD**. Disponível em: <<https://www.nicd.ac.za/source-of-listeria-outbreak-identified/>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

NUFER, U.; STEPHAN, R.; TASARA, T. Growth characteristics of *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri* and *Listeria innocua* strains in broth cultures and a sliced bologna-type product at 4 and 7 °C. **Food Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 444–451, 1 ago. 2007.

OMAC, B. et al. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* on fresh baby spinach leaves: Effect of storage temperature and natural microflora. **Postharvest Biology and Technology**, v. 100, p. 41–51, 1 fev. 2015.

PAL, A.; LABUZA, T. P.; DIEZ-GONZALEZ, F. Evaluating the Growth of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated Ready-to-Eat Frankfurters: Influence of Strain, Temperature, Packaging, Lactate and Diacetate, and Background Microflora. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 9, p. 1806–1816, 1 set. 2008.

PALUMBO, S. A.; WILLIAMS, A. C. Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. **Food Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 63–68, 1 mar. 1991.

PARO RODRIGUES CESAR, A. et al. *Listeria* spp. E *Listeria monocytogenes* NA PRODUÇÃO DE SALSICHAS TIPO HOT DOG. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 339–352, 25 jun. 2011.

PIN, C.; METRIS, A.; BARANYI, J. Next generation of predictive models. **Woodhead Publishing Limited**, 2013. v. 1, p. 498-515, 2013.

PORTO, A. C. S.; CALL, J. E.; LUCHANSKY, J. B. Effect of reheating on viability of a five-strain mixture of *Listeria monocytogenes* in vacuum-sealed packages of frankfurters following refrigerated or frozen storage. **Journal of food protection**, v. 67, n. 1, p. 71–76, 2004.

PRADHAN, A. K. et al. Quantitative Risk Assessment of Listeriosis-Associated Deaths Due to *Listeria monocytogenes* Contamination of Deli Meats Originating from Manufacture and Retail. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 4, p. 620–630, 1 abr. 2010.

PRADHAN, A. K. et al. A modified Weibull model for growth and survival of *Listeria innocua* and *Salmonella Typhimurium* in chicken breasts during refrigerated and frozen storage. **Poultry Science**, v. 91, n. 6, p. 1482–1488, 1 jun. 2012.

RANJBARAN, M.; CARCIOFI, B. A. M.; DATTA, A. K. For Peer Review For P. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2021.

RATKOWSKY, D. A. et al. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. **Journal of Bacteriology**, v. 154, n. 3, p. 1222, 1983.

RIFFLE, R. **Kraft Recall: Temperature Danger Zone**. Disponível em: <<https://www.statefoodsafety.com/Resources/Resources/kraft-singles-recall-temperature-danger-zone>>. Acesso em: 25 jan. 2022.

RISTORI, C. A. et al. Prevalence and Populations of *Listeria monocytogenes* in Meat Products Retailed in Sao Paulo, Brazil. <https://home.liebertpub.com/fpd>, v. 11, n. 12, p. 969–973, 12 dez. 2014.

RODRIGUES, C. S. **Contaminação por *Listeria monocytogenes* em salsichas produzidas no Brasil em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção federal**. Brasília: Universidade de Brasília. Dissertação de Mestrado, 2016.

RODRIGUES, C. S.; DE SÁ, C. V. G. C.; DE MELO, C. B. An overview of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. **Ciência Rural**, v. 47, n. 2, 8 dez. 2016.

RODRIGUES, I. et al. Understanding salt reduction in fat-reduced hot dog sausages: Network structure, emulsion stability and consumer acceptance. **Food Science and Technology International**, v. 26, n. 2, p. 123–131, 1 mar. 2020.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 5, p. 501–508, 1 nov. 1996.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3–4, p. 241–264, 1 nov. 1994.

RUIZ-CAPILLAS, C. et al. Properties of reformulated hot dog sausage without added nitrites during chilled storage. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 1, p. 21–30, 1 jan. 2016.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Characteristics of *Listeria monocytogenes* Important to Food Processors**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

SCHERF BD, PILLING D, E. FAO. The second reports on the state of World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. **Agriculture**, p. 800–800, 2004.

SCHMID, B. et al. Role of Cold Shock Proteins in Growth of *Listeria monocytogenes* under Cold and Osmotic Stress Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1621, mar. 2009.

SERGELIDIS, D. et al. Microbiological hazards at several stages of production and distribution of cooked sausages. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 53, n. 3, p. 201–218, 25 jan. 2018.

SILVA, N. B. **Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus***

viridescens sob condições não isotérmicas em presunto fatiado embalado a vácuo. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado, 2015.

STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLU, E. Predictive Modeling of Microbial Behavior in Food. **Foods**, v. 8, n. 12, p. 654, 6 dez. 2019.

SWINNEN, I. A. M. et al. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 137–159, 15 jul. 2004.

TAMPLIN, M. L. Integrating predictive models and sensors to manage food stability in supply chains. **Food Microbiology**, v. 75, p. 90–94, 1 out. 2018.

TAORMINA, P. J.; BEUCHAT, L. R. Survival and Growth of Alkali-Stressed *Listeria monocytogenes* on Beef Frankfurters and Thermotolerance in Frankfurter Exudates. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 2, p. 291–298, 1 fev. 2002.

TSALOUMI, S. et al. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) cooked meat products sliced at retail stores in Greece. **Food Microbiology**, v. 99, p. 103800, 1 out. 2021.

VAN IMPE, J. F. et al. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2901–2909, 1992.

VAN IMPE, J. F. et al. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1–3, p. 97–105, 15 abr. 2005.

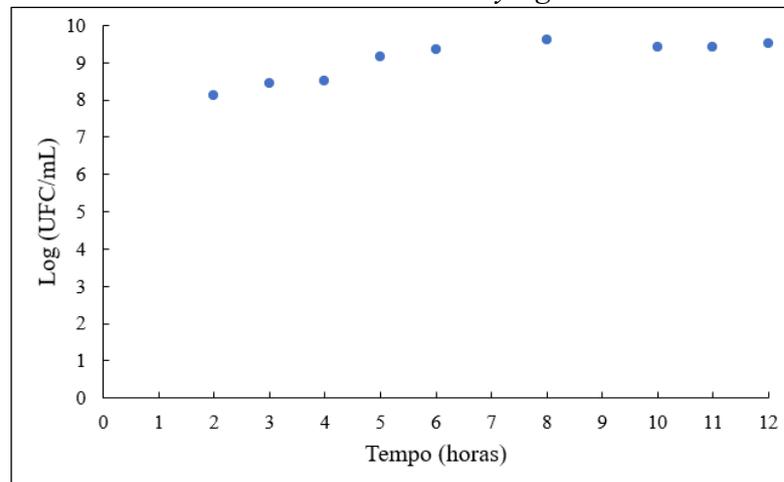
WALKER, S. J.; ARCHER, P.; BANKS, J. G. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, n. 2, p. 157–162, 1 fev. 1990.

WALLS, I.; SCOTT, V. N. Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, n. 2–3, p. 97–102, 20 maio 1997.

ZENG, W. et al. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in Packaged Fresh-Cut Romaine Mix at Fluctuating Temperatures during Commercial Transport, Retail Storage, and Display. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 2, p. 197–206, 1 fev. 2014.

ZHANG, X. et al. 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, 1 out. 2021.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875, 1990.

ANEXO 1 - Cinética de crescimento de *L. monocytogenes* em caldo BHIFigura 24 - Cinética de crescimento de *L. monocytogenes* em meio de cultivo BHI.

Fonte: elaborado pela autora (2022).

ANEXO 2 – Teste para determinação da concentração, diluição e volume do inóculo

Na Tabela 12 estão apresentadas as combinações testadas para a determinação da concentração de inóculo (UFC/mL), primeira diluição (g APP : g salsicha) e volume de inóculo inoculado nas amostras (mL). O objetivo destes testes foi a obtenção da menor concentração inoculada que possibilitasse a quantificação de *L. monocytogenes* na salsicha pelo método de plaqueamento em ágar.

Tabela 7 - Teste para determinação da concentração de inóculo, diluição e volume de inóculo inoculado.

Concentração do inóculo (log UFC/mL)	Diluição (g APP : g salsicha)	Volume de inóculo inoculado (mL)	Recuperação (log UFC/mL)
5	1:1	0,1	2,49
5	1:2	0,1	2,32
5	1:1	1	incontável
5	1:2	1	3,42

Fonte: elaborado pela autora (2022).

Foi observado que com o volume de inóculo de 0,1 mL se espalhou melhor pela amostra sem que houvesse acúmulo de líquido no saco de amostragem após o massageamento, este volume foi escolhido em conjunto com a diluição 1:1 pela facilidade de preparo de material e pela boa recuperação (contagem em placa) do inóculo adicionado.

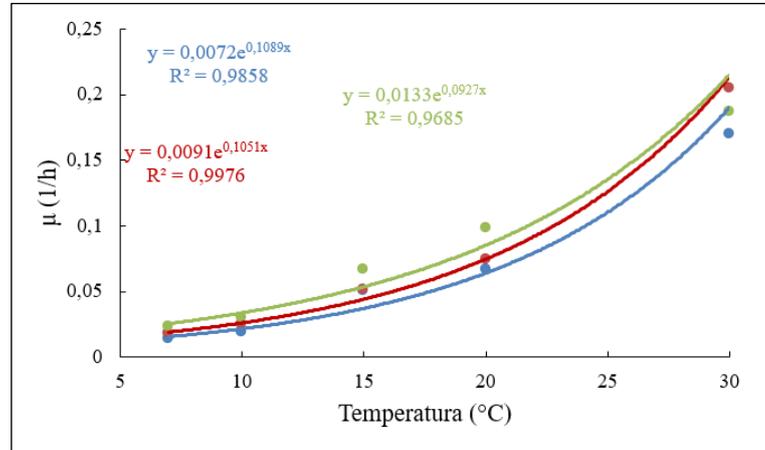
ANEXO 3 – Leituras de temperatura por *Datalogger*.Tabela 8 - Leituras de temperaturas isotérmicas por *Datalogger*

Média (°C)	Mínima (°C)	Máxima (°C)
-11,3	-10,9	-11,8
6,9	6,5	7,2
10,1	9,4	10,7
15,3	15,2	15,4
19,9	19,8	19,9
30,1	29,9	30,3

Fonte: elaborado pela autora (2022).

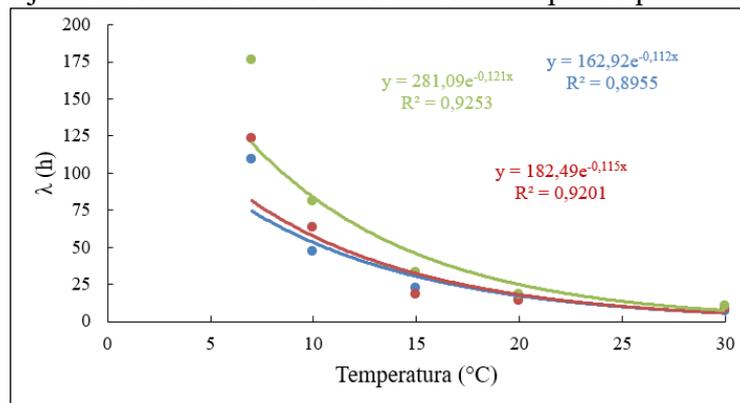
ANEXO 4 - Modelos secundários

Figura 25 - Ajuste do modelo secundário exponencial para o parâmetro μ .



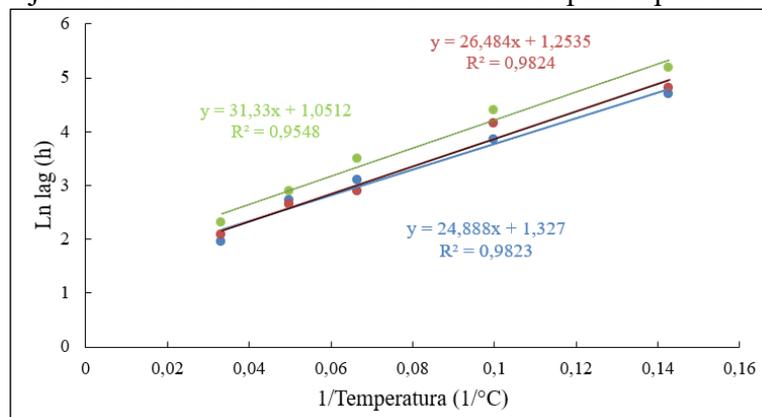
Fonte: elaborado pela autora (2022).

Figura 26 – Ajuste do modelo secundário da Potência para o parâmetro λ .



Fonte: elaborado pela autora (2022).

Figura 27 – Ajuste do modelo secundário de Arrhenius para o parâmetro λ .



Fonte: elaborado pela autora (2022).

ANEXO 5 - Parâmetros primários de crescimento.

Tabela 9 - Parâmetros primários de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C sem e com congelamento prévio de 30 e 90 dias (Grupos A, B e C, respectivamente).

T (°C)	Condição de incubação (Grupo)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	λ (h)	h_0	$N_{m\acute{a}x}$ (log UFC/cm ²)
7	A	0,014 ± 0,000*	109 ± 5	3,5	6,51 ± 0,04
	B	0,018 ± 0,000*	123 ± 7	5,1	6,82 ± 0,08
	C	0,023 ± 0,000*	176 ± 6	9,3	7,17 ± 0,05
10	A	0,019 ± 0,001	47 ± 12	2,1	6,12 ± 0,20
	B	0,025 ± 0,001	63 ± 8	3,6	6,50 ± 0,01
	C	0,030 ± 0,001	81 ± 6	5,6	6,64 ± 0,05
15	A	0,050 ± 0,003	22 ± 4	2,5	5,89 ± 0,02
	B	0,051 ± 0,002	18 ± 3	2,1	6,89 ± 0,02
	C	0,067 ± 0,004	33 ± 3	5,1	7,06 ± 0,14
20	A	0,067 ± 0,003	15 ± 3	2,3	6,00 ± 0,01
	B	0,074 ± 0,004	14 ± 3	2,4	6,68 ± 0,01
	C	0,098 ± 0,008	18 ± 3	4,1	6,56 ± 0,15
30	A	0,170 ± 0,003	7 ± 0*	2,7	5,71 ± 0,07
	B	0,205 ± 0,011	8 ± 1	3,8	6,07 ± 0,10
	C	0,187 ± 0,013	10 ± 1	4,3	6,39 ± 0,15

* Menor que o limite de detecção do método.

Fonte: elaborado pela autora (2022).

ANEXO 6 – Dados experimentais: contagem de *L. monocytogenes* em salsicha.

Tabela 10 - Contagens de *L. monocytogenes* em salsicha para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C sem congelamento prévio (Grupos A).

T (°C)	Tempo (h)	Log N/N ₀ ± DP
7	0	0 ± 0
	48	0,11 ± 0,15
	120	0,57 ± 0,09
	192	1,07 ± 0,09
	384	3,79 ± 0,34
	480	5,24 ± 0,05
	550	6,01 ± 0,17
	624	6,41 ± 0,06
	720	6,45 ± 0,04
	816	6,48 ± 0,03
	0	0 ± 0
	48	0,13 ± 0,01
	120	0,48 ± 0,07
	192	1,23 ± 0,01
	288	2,28 ± 0,03
	384	3,98 ± 0,07
	480	5,26 ± 0,11
	624	6,5 ± 0,01
	720	6,55 ± 0,07
816	6,54 ± 0,10	
10	0	0 ± 0
	120	0,98 ± 0,06
	192	2,84 ± 0,19
	264	3,76 ± 0
	312	4,87 ± 0,42
	360	5,67 ± 0,41
	408	5,95 ± 0,24
	0	0 ± 0
	48	0,15 ± 0,09
	72	0,56 ± 0,07
	120	1,54 ± 0,03
	168	3,13 ± 0,14
	312	5,65 ± 0,07
	360	5,91 ± 0,10
408	6,05 ± 0,15	
456	6,28 ± 0,10	

Continuação

	0	0 ± 0
	12	$0,08 \pm 0,13$
	24	$0,03 \pm 0,12$
	36	$1,15 \pm 0,08$
	60	$1,71 \pm 0,16$
	84	$2,99 \pm 0,11$
	108	$4,14 \pm 0,04$
	132	$5,46 \pm 0,02$
	144	$6,14 \pm 0,04$
	156	$6,21 \pm 0,01$
	180	$6,2 \pm 0,03$
15	0	0 ± 0
	12	$0,17 \pm 0,21$
	24	$0,24 \pm 0,07$
	36	$1,13 \pm 0,06$
	60	$1,81 \pm 0,38$
	84	$3,03 \pm 0,13$
	108	$4,22 \pm 0,11$
	132	$5,43 \pm 0,06$
	144	$6,03 \pm 0,09$
	156	$6,19 \pm 0,01$
	180	$6,39 \pm 0,03$
	0	0 ± 0
	8	0 ± 0
	19	$0,18 \pm 0$
	28	$0,82 \pm 0,36$
	43	$2,26 \pm 0,13$
	58	$3,32 \pm 0,55$
	74	$4,42 \pm 0,03$
	94	$5,06 \pm 0,11$
	115	$5,67 \pm 0$
	140	$5,69 \pm 0,1$
	165	$5,86 \pm 0$
20	0	0 ± 0
	8	$0 \pm 0,11$
	19	$0,31 \pm 0$
	28	$0,86 \pm 0,19$
	54	$2,5 \pm 0,02$
	74	$3,92 \pm 0,19$
	94	$4,92 \pm 0,39$
	115	$5,87 \pm 0,15$
	140	$6,23 \pm 0,07$
	165	$6,32 \pm 0,07$
	190	$6,27 \pm 0,07$

Continuação

	0	0 ± 0
	4	$0,07 \pm 0,03$
	9	$0,35 \pm 0,1$
	14	$1,08 \pm 0,33$
	22	$2,58 \pm 0,1$
	28	$3,66 \pm 0,08$
	34	$4,32 \pm 0,09$
	41	$5,09 \pm 0,16$
	49	$5,37 \pm 0,02$
	57	$5,48 \pm 0,24$
30	65	$5,74 \pm 0,29$
	0	0 ± 0
	3	0 ± 0
	8	$0,46 \pm 0,04$
	13	$1 \pm 0,13$
	22	$2,51 \pm 0,08$
	27	$3,52 \pm 0,06$
	34	$4,8 \pm 0,07$
	40	$5,43 \pm 0,05$
	49	$6,05 \pm 0,11$
	57	$5,88 \pm 0,08$
	65	$5,9 \pm 0,05$

Fonte: elaborado pela autora (2022).

Tabela 11 – Contagens de *L. monocytogenes* em salsicha para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C com congelamento prévio de 30 dias (Grupos B).

T (°C)	Tempo (h)	Log N/N ₀ ± DP
7	0	0 ± 0
	60	0 ± 0
	144	0,7 ± 0,03
	192	1,27 ± 0,20
	288	2,72 ± 0,15
	384	4,39 ± 0,62
	480	5,97 ± 0,18
	0	0 ± 0,02
	144	0,44 ± 0,19
	288	2,85 ± 0,09
	384	4,9 ± 0,03
	480	6,4 ± 0,12
	550	6,61 ± 0,14
	624	6,81 ± 0,04
	720	6,87 ± 0,02
	816	6,87 ± 0,03
10	0	0 ± 0
	36	0,14 ± 0,04
	72	0,36 ± 0,04
	120	1,61 ± 0,04
	168	3,1 ± 0
	216	4,39 ± 0,33
	264	5,23 ± 0,09
	312	5,92 ± 0,10
	360	6,19 ± 0,26
	408	6,69 ± 0,01
	456	6,91 ± 0,18
	0	0 ± 0
	48	0 ± 0
	72	0,29 ± 0,07
	120	1,27 ± 0,26
	168	2,08 ± 0,06
	216	4,31 ± 0,26
	264	5,12 ± 0,02
	312	5,65 ± 0,02
	360	6,27 ± 0,06
408	6,55 ± 0,08	
456	6,63 ± 0,03	

Continuação

	0	$0 \pm 0,2$
	12	$0,09 \pm 0,02$
	24	$0,04 \pm 0,17$
	36	$0,35 \pm 0,08$
	60	$2,22 \pm 0,01$
	84	$3,56 \pm 0,19$
	108	$5,09 \pm 0,24$
	132	$5,66 \pm 0,02$
	144	$6,44 \pm 0,03$
	156	$6,99 \pm 0,11$
15	180	$7,1 \pm 0,1$
	0	0 ± 0
	12	$0,16 \pm 0,07$
	24	$0,32 \pm 0,03$
	36	$0,62 \pm 0,18$
	60	$2,15 \pm 0,13$
	84	$3,46 \pm 0,06$
	108	$4,8 \pm 0,01$
	132	$5,64 \pm 0,11$
	144	$6,38 \pm 0,11$
	156	$7,01 \pm 0,17$
	180	$6,97 \pm 0,36$
	0	0 ± 0
	8	$0,16 \pm 0,06$
	19	$0,24 \pm 0,17$
	28	$0,8 \pm 0$
	43	$2,02 \pm 0,14$
	74	$3,68 \pm 0,08$
	94	$5,62 \pm 0,23$
	115	$6,65 \pm 0,07$
	140	$6,7 \pm 0,08$
	165	$6,83 \pm 0,04$
20	0	0 ± 0
	8	$0,2 \pm 0,09$
	19	$0,6 \pm 0,12$
	28	$1,06 \pm 0,53$
	43	$2,81 \pm 0,04$
	58	$3,66 \pm 0,02$
	74	$4,87 \pm 0,05$
	94	$6,2 \pm 0,04$
	115	$6,51 \pm 0,14$
	140	$6,63 \pm 0,01$
	165	$6,65 \pm 0$

Continuação

	0	0 ± 0
	4	$0,04 \pm 0,03$
	9	$0,16 \pm 0$
	14	$0,75 \pm 0,01$
	23	$3,05 \pm 0,58$
	28	$4,16 \pm 0,11$
	34	$5,44 \pm 0$
	40	$5,49 \pm 0,25$
	49	$6,14 \pm 0,05$
30	57	$6,23 \pm 0$
	65	$6,23 \pm 0,35$
	0	0 ± 0
	9	$0,72 \pm 0,01$
	14	$1,36 \pm 0,10$
	23	$2,81 \pm 0,07$
	28	$4,26 \pm 0,37$
	34	$5,06 \pm 0,14$
	40	$5,57 \pm 0,02$
	49	$5,99 \pm 0,10$
	57	$6,35 \pm 0,08$

Fonte: elaborado pela autora (2022).

Tabela 12 – Contagens de *L. monocytogenes* em salsicha para as temperaturas de 7, 10, 15, 20 e 30 °C com congelamento prévio de 90 dias (Grupos C).

T (°C)	Tempo (h)	Log N/N ₀ ± DP
7	0	0 ± 0,05
	384	4,64 ± 0,09
	480	6,93 ± 0,06
	550	7,21 ± 0,10
	624	7,21 ± 0,03
	0	0 ± 0,03
	48	0,1 ± 0,09
	120	0,17 ± 0,12
	192	0,58 ± 0,02
	288	2,6 ± 0,02
	384	4,5 ± 0,04
	550	7,1 ± 0,09
	624	7,11 ± 0,05
	720	7,11 ± 0,01
	10	0
48		0 ± 0
72		0,1 ± 0
120		0,75 ± 0,25
168		2,13 ± 0,37
216		4,18 ± 0,1
264		5,6 ± 0,07
312		6,67 ± 0,14
360		6,6 ± 0,07
408		6,65 ± 0,03
456		6,61 ± 0,07
0		0 ± 0
48		0,06 ± 0,01
72		0,28 ± 0,03
120		1,64 ± 0,02
168	2,99 ± 0,03	
216	4,17 ± 0,1	
264	5,23 ± 0,06	
312	6,47 ± 0	
360	6,4 ± 0,03	
408	6,45 ± 0,02	
456	7,06 ± 0,34	

Continuação

	0	0 ± 0
	12	$0,18 \pm 0,1$
	24	$0,21 \pm 0,04$
	36	$0,75 \pm 0,06$
	60	$2,11 \pm 0,11$
	84	$3,96 \pm 0,07$
	108	$5,07 \pm 0,05$
	132	$6,76 \pm 0,06$
	144	$7,18 \pm 0,05$
	156	$7,36 \pm 0,11$
15	180	$7,29 \pm 0,08$
	0	0 ± 0
	12	0 ± 0
	24	$0,02 \pm 0,01$
	36	$0,12 \pm 0,04$
	60	$1,23 \pm 0$
	84	$3,21 \pm 0,06$
	108	$5,01 \pm 0,07$
	132	$6,06 \pm 0,03$
	144	$6,63 \pm 0,12$
	156	$6,8 \pm 0,07$
	180	$6,79 \pm 0,14$
	0	0 ± 0
	8	$0,15 \pm 0,11$
	19	$0,66 \pm 0,04$
	28	$1,63 \pm 0,05$
	43	$2,72 \pm 0,06$
	58	$4,58 \pm 0,09$
	74	$5,63 \pm 0,04$
	94	$6,67 \pm 0,02$
	115	$6,72 \pm 0,05$
20	140	$6,79 \pm 0,06$
	165	$6,87 \pm 0,16$
	0	0 ± 0
	8	$0,1 \pm 0,08$
	19	$0,1 \pm 0,05$
	28	$0,46 \pm 0,02$
	43	$1,7 \pm 0,21$
	58	$3,52 \pm 0,10$
	74	$5,28 \pm 0,03$
	94	$6,21 \pm 0,10$
	115	$6,29 \pm 0,10$

Continuação

20	140	$6,31 \pm 0,04$
	0	0 ± 0
	4	$0,36 \pm 0,07$
	9	$0,36 \pm 0,06$
	14	$1,15 \pm 0,16$
	23	$2,86 \pm 0,07$
	28	$3,82 \pm 0,06$
	34	$4,51 \pm 0,07$
	40	$5,8 \pm 0,01$
	49	$6,36 \pm 0,02$
	57	$6,48 \pm 0,12$
	65	$6,64 \pm 0,03$
30	0	0 ± 0
	4	$0,01 \pm 0$
	9	$0,1 \pm 0,02$
	14	$0,4 \pm 0,16$
	23	$1,76 \pm 0,04$
	28	$2,56 \pm 0,43$
	34	$4 \pm 0,07$
	40	$5,5 \pm 0,04$
	49	$6,05 \pm 0,01$
	57	$6,2 \pm 0,23$
	65	$6,41 \pm 0,05$

Fonte: elaborado pela autora (2022).

Tabela 13 - Contagens de *L. monocytogenes* em salsicha para as condições não isotérmicas de temperatura 1 e 2.

Condição	Tempo (h)	Log N/N ₀ ± DP
1	0	0 ± 0
	12	0 ± 0,08
	15	0,04 ± 0,09
	18	0,00 ± 0,10
	21	0,19 ± 0
	24	0,04 ± 0
	60	0,35 ± 0
	63	0,73 ± 0
	70	0,46 ± 0
	82	0,93 ± 0
	94	0,64 ± 0
	118	1,23 ± 0
	166	1,86 ± 0,11
	214	2,61 ± 0,09
	262	3,16 ± 0,05
	310	3,99 ± 0,30
	358	5,43 ± 0,07
	406	5,46 ± 0
	454	5,56 ± 0
	502	5,70 ± 0
	0	0 ± 0
	12	0 ± 0
	15	0 ± 0,05
	18	0 ± 0,07
	21	0 ± 0
	24	0 ± 0
	60	0,23 ± 0
	63	0,27 ± 0
	69	0,34 ± 0
	144	1,30 ± 0
180	1,58 ± 0	
204	2,38 ± 0	
252	2,93 ± 0	
300	4,05 ± 0,08	
348	4,64 ± 0,09	
396	5,39 ± 0	
444	5,61 ± 0,05	
492	5,65 ± 0	

Continuação

	0	0 ± 0
	12	0 ± 0
	24	0 ± 0
	36	$0,20 \pm 0$
	48	$0,19 \pm 0$
	60	$0,48 \pm 0$
	72	$0,93 \pm 0$
	84	$1,71 \pm 0$
	96	$2,05 \pm 0$
	108	$2,02 \pm 0$
	120	$2,37 \pm 0$
	144	$1,70 \pm 0$
	156	$2,59 \pm 0,02$
	180	$3,11 \pm 0$
	204	$3,36 \pm 0$
	252	$4,17 \pm 0$
	276	$4,59 \pm 0$
	300	$5,42 \pm 0,04$
	324	$5,52 \pm 0,04$
	348	$5,41 \pm 0,05$
2	372	$5,58 \pm 0,01$
	0	0 ± 0
	12	$0,08 \pm 0$
	24	0 ± 0
	36	$0,11 \pm 0$
	48	$0,30 \pm 0$
	60	$0,52 \pm 0$
	72	$0,97 \pm 0$
	84	$0,89 \pm 0$
	96	$2,48 \pm 0,01$
	108	$2,64 \pm 0$
	120	$2,34 \pm 0,06$
	144	$3,17 \pm 0,01$
	156	$3,50 \pm 0$
	180	$3,64 \pm 0,10$
	204	$4,04 \pm 0,11$
	252	$4,84 \pm 0$
	276	$5,72 \pm 0$
	300	$5,38 \pm 0$
	324	$5,81 \pm 0$
	348	$5,70 \pm 0$

Fonte: elaborado pela autora (2022).