



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO –
CAMPUS MORRINHOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

ALINE NUNES DOS SANTOS

**MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO DE *LISTERIA*
MONOCYTOGENES EM QUEIJO BRANCO FATIADO: UMA ABORDAGEM
UTILIZANDO O *SOFTWARE MICRORISK LAB***

Morrinhos

2022

ALINE NUNES DOS SANTOS

**MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO DE *LISTERIA*
MONOCYTOGENES EM QUEIJO BRANCO FATIADO: UMA ABORDAGEM
UTILIZANDO O *SOFTWARE MICRORISK LAB***

Trabalho de Curso apresentado ao Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, do Instituto Federal Goiano - Campus Morrinhos, como pré-requisito para a obtenção do grau de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Wiaslan Figueiredo Martins.

Morrinhos

2022

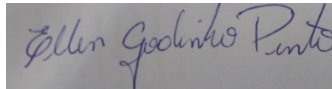
ALINE NUNES DOS SANTOS

**MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO DE *LISTERIA*
MONOCYTOGENES EM QUEIJO BRANCO FATIADO: UMA ABORDAGEM
UTILIZANDO O *SOFTWARE MICRORISK LAB***

Aprovada 30 de setembro de 2022, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

Wiaslan Figueiredo Martins

Prof. Dr. Wiaslan Figueiredo Martins
IF Goiano – Campus Morrinhos
(Orientador)



Profa. Ma. Ellen Godinho Pinto
IF Goiano – Campus Morrinhos
(Membro interno)



Danielle de Sousa Severo
Universidade Federal de Santa Catarina
(Membro externo)

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

dos Santos, Aline Nunes
dD724m MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO DE LISTERIA
MONOCYTOGENES EM QUEIJO BRANCO FATIADO: UMA
ABORDAGEM UTILIZANDO O SOFTWARE MICRORISK LAB /
Aline Nunes dos Santos; orientador Wiaslan
Figueiredo Martins. -- Morrinhos, 2022.
38 p.

TCC (Graduação em Tecnologia em Alimentos) --
Instituto Federal Goiano, Campus Morrinhos, 2022.

1. Patógeno. 2. Segurança de alimentos. 3.
Microbiologia preditiva. I. Figueiredo Martins,
Wiaslan, orient. II. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

<input type="checkbox"/> Tese (doutorado)	<input type="checkbox"/> Artigo científico
<input type="checkbox"/> Dissertação (mestrado)	<input type="checkbox"/> Capítulo de livro
<input type="checkbox"/> Monografia (especialização)	<input type="checkbox"/> Livro
<input checked="" type="checkbox"/> TCC (graduação)	<input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento
<input type="checkbox"/> Produto técnico e educacional - Tipo:	<input type="text"/>
Nome completo do autor:	Matrícula:
<input type="text" value="Aline Nunes dos Santos"/>	<input type="text" value="2018104210310246"/>
Título do trabalho:	
<input type="text" value="MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO DE LISTERIA MONOCYTOGENES EM QUEIJO BRANCO FATIADO: UMA ABORDAGEM UTILIZANDO O SOFTWARE MICRORISK LAB"/>	

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: Não Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIIF Goiano: | / | / |

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

|
Local Data

Aline Nunes dos Santos

Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

Wladimir Inguineiro Fontes

Assinatura do(a) orientador(a)

Anexo 8
Ata da Defesa

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CURSO – TC

No dia 30 de setembro de 2022 às 19 horas e 30 minutos, pela interface de comunicação *Google Meet*, desenvolvido pela empresa *Google*, ocorreu a banca de defesa do trabalho de curso (TC) intitulado **Modelagem matemática do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo branco fatiado: uma abordagem utilizando o software *Microrisk lab***, da aluna Aline Nunes dos Santos, sob a orientação do professor Dr. Wiaslan Figueiredo Martins do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos. A banca de avaliação foi composta pelos membros, Ellen Godinho Pinto e Danielle de Sousa Severo.

A média obtida foi 9,0 (nove vírgula zero), sendo considerada a aluna

- () aprovada sem ressalvas.
- (X) aprovada com ressalvas.
- () não foi aprovada.

Morrinhos, 30 de setembro de 2022

Wiaslan Figueiredo Martins

Professor Orientador

Ellen Godinho Pinto

Membro da Banca de Avaliação

Danielle

Membro da Banca de Avaliação

RESUMO

O queijo é um derivado lácteo pronto para consumo susceptível ao crescimento de diversos micro-organismos deteriorantes e patogênicos, dentre os últimos destaca-se *Listeria monocytogenes*. Essa bactéria pode entrar em ambientes de processamento de queijos por meio do leite cru e aderirem às superfícies de contato com alimentos e formarem biofilmes, que são difíceis de eliminar, podendo resultar em contaminação cruzada do queijo. Nesse contexto, objetivou-se, neste trabalho, modelar o crescimento de *L. monocytogenes* em fatias de queijo branco sob diferentes condições isotérmicas de armazenamento, utilizando o *software Microrisk Lab*. Os dados de crescimento de *L. monocytogenes* nas temperaturas entre 5 °C e 25 °C de armazenamento foram adquiridos da pesquisa de Uhlich e colaboradores (2006), publicada no *Journal of Food Safety*, disponíveis na base de dados *ComBase*. O modelo de Baranyi e Roberts foi ajustado às curvas de crescimento utilizando o *MicroRisk Lab*, disponível *online*. De acordo com os resultados, pode-se afirmar que o modelo apresentou ótimo desempenho para descrever o crescimento de *L. monocytogenes* em fatias de queijo branco nas cinco temperaturas avaliadas, com valores de $R^2 \geq 0,978$. Os modelos secundários representaram bem a influência da temperatura na velocidade específica máxima de crescimento, com melhor valor de coeficiente de determinação para o modelo do tipo Arrhenius ($R^2 = 0,994$). Além disso, foi possível realizar duas simulações do crescimento de *L. monocytogenes*, utilizando o *ComBase*, em duas diferentes condições de oscilação de temperatura (5-10-15-20 °C e 25-20-15-10 °C), aplicando a equação diferencial do modelo de Baranyi e Roberts. Pode-se verificar que o modelo foi capaz de descrever o comportamento microbiano, utilizando o modelo secundário do tipo Arrhenius. Enquanto as previsões utilizando o *ComBase* apresentou um comportamento mais próximo do simulado neste trabalho para a condição de oscilação partindo de temperaturas elevadas. No entanto, dados experimentais são necessários para validar o modelo preditivo em condições não isotérmicas de armazenamento. Assim, pode-se concluir que a aplicação de modelos preditivos e *softwares* de fácil utilização podem ser usados para orientar os proprietários de restaurantes, estabelecimentos e indústrias de laticínios, para preparar e armazenar adequadamente o queijo fresco fatiado e outros produtos relacionados para evitar o crescimento de *L. monocytogenes*.

Palavras-chave: Patógeno, segurança de alimentos, microbiologia preditiva.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	12
3.1.1 Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijos	13
3.1.2 Controle de <i>Listeria monocytogenes</i> na indústria	14
3.2 MICROBIOLOGIA PREDITIVA	15
3.2.1 <i>Software MicroRisk Lab</i>	16
4. METODOLOGIA	18
4.1 DADOS DE CRESCIMENTO	18
4.2 MODELAGEM PRIMÁRIA	18
4.3 MODELAGEM SECUNDÁRIA	19
4.4 ANÁLISES NUMÉRICAS	19
4.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO MODELO PRIMÁRIO E DO MODELO SECUNDÁRIO	20
4.6 MODELO NÃO ISOTÉRMICO	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÃO	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um micro-organismo ubíquo; comumente encontrado no solo, água, animais e em vários ambientes voltados para o ser humano, incluindo instalações de processamento de alimentos (MCINTYRE et al., 2015). A contaminação por *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo (APC), incluindo diversas categorias de alimentos, como frutas e vegetais, frios, frutos do mar e laticínios é uma grande preocupação (RÜCKERL et al., 2014). Alimentos com alto teor de umidade e longa vida útil, mesmo em temperaturas de refrigeração, representam alimentos que podem suportar o crescimento de *L. monocytogenes* suficientes para atingir doenças infecciosas (D'AMICO et al., 2010; BARRÍA et al., 2020).

O queijo é um dos produtos lácteos fermentados mais antigos, e já era produzido há 8.000 anos no Oriente Médio (GOBBETTI et al., 2018). Atualmente, mais de 1200 variedades de queijo podem ser encontradas em todo o mundo, variando em termos de textura, aspecto, aroma e sabor (TILOCCA et al., 2020). Os queijos artesanais são essencialmente artesanais em fazendas e com leite cru (KAMIMURA et al., 2020). Os queijos de leite cru apresentam sabores mais pronunciados do que os queijos produzidos com leite tratado termicamente (YOON et al., 2016). Além de papéis sensoriais e tecnológicos, a microbiota de queijos de leite cru pode desempenhar um papel antagônico contra patógenos de origem alimentar, incluindo *L. monocytogenes* (CHOI et al., 2020; YOON et al., 2016).

As infecções por *L. monocytogenes* podem causar doenças graves ou mesmo fatalidades entre as mulheres grávidas, bebês e crianças pequenas, idosos e indivíduos imunocomprometidos (GÉRARD et al., 2018; HÁ et al., 2012; MURRU et al., 2018). Assim, é importante inativar *L. monocytogenes* durante a produção de queijo. No entanto, mesmo que o leite seja pasteurizado durante a produção do queijo, ele pode ser contaminado com patógenos após o corte, fatiamento e embalagem, bem como durante o transporte (CDC, 2016). Portanto, etapas adicionais de descontaminação são necessárias para inativar os patógenos durante o manuseio do queijo após a fabricação.

Os micro-organismos deteriorantes e patogênicos em alimentos consiste em um aspecto relevante para a segurança de alimentos. Nesse aspecto, a microbiologia preditiva é uma ferramenta importante no desenvolvimento de pesquisas, possibilitando estimar os efeitos das operações de manipulação, de processamento, de armazenamento e de transporte de alimentos sobre o crescimento, sobrevivência e inativação dos micro-organismos (USDA, 2016). Para isso, a microbiologia preditiva engloba conceitos de microbiologia, matemática, estatística e informática para estudar a dinâmica de

crescimento de micro-organismos. Ela baseia-se em análise de todas as fases de crescimento ou inativação do micro-organismo (SCHLEI, 2018).

As ferramentas interativas em microbiologia preditiva, também conhecidos como modelos terciários, têm sido utilizadas para estudar o comportamento dos micro-organismos nos alimentos, considerando a composição do alimento e as condições de armazenamento. Essas ferramentas são *softwares* que podem ser *online* ou baixados em diferentes plataformas, sendo muitos deles de acesso gratuito, como o *Microrisk Lab* (LIU et al., 2021).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Modelar o efeito de diferentes temperaturas de armazenamento de queijo branco fatiado no crescimento de *Listeria monocytogenes* utilizando o software *Microrisk Lab*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um levantamento dos dados de crescimento de *L. monocytogenes* disponíveis na base de dados *ComBase*;
- Ajustar o modelo primário às curvas de crescimento de *L. monocytogenes* obtidas em diferentes temperaturas de armazenamento, considerando faixa de temperatura de refrigeração e abuso e avaliar o seu desempenho por meio dos índices estatísticos;
- Avaliar a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento de *L. monocytogenes* por meio do ajuste de modelos secundários e selecionar o melhor modelo que descreva essa influência;
- Simular a predição do crescimento de *L. monocytogenes* em diferentes oscilações de temperaturas (condições não isotérmicas).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *LISTERIA MONOCYTOGENES*

A *L. monocytogenes*, agente etiológico da listeriose, é reconhecida como entidade patogênica para os animais desde 1926; contudo, somente na década de 1980 ela passou a merecer maior consideração em saúde pública, quando se reconheceu a importância dos alimentos na cadeia de transmissão da infecção ao homem. É uma bactéria patogênica oportunista, capaz de sobreviver e multiplicar-se fora do organismo dos hospedeiros em meios com nutrientes simples; nos animais e no homem multiplica-se intracelularmente (GERMANO; GERMANO, 2019).

A *L. monocytogenes* é um bacilo Gram-positivo, não formador de esporos, catalase positivo e anaeróbio facultativo. Apresenta mobilidade a 25 °C, caracterizada por “saltos”, mas a 35 °C torna-se imóvel. A principal característica dessa bactéria é a capacidade de se multiplicar à temperatura de refrigeração, em meios simples, sem grandes exigências nutricionais (FARBER; PETERKIN, 1991; BUCHANAN et al., 2017). Assim, é capaz de crescer em temperaturas entre -0,4 e 50 °C, permitindo que as bactérias se multipliquem em produtos alimentícios, mesmo quando devidamente refrigerados, além de resistir a sucessivos congelamentos e descongelamentos (TIENUNGOON et al., 2000).

As cepas de *L. monocytogenes* são resistentes a condições comuns de processamento de alimentos, como pH extremo, altas concentrações de sal, baixa atividade de água e temperaturas de refrigeração, tornando-se uma grande preocupação para a indústria de alimentos. O tempo de geração a 35 °C varia de minutos a horas, na dependência do meio em que se encontra. O intervalo de pH ótimo é de 6 a 8, mas pode crescer entre 5 e 9. Pode sobreviver por mais de 100 dias a 4 °C, em concentrações entre 10,5 e 30,5% de cloreto de sódio e pode se desenvolver em alimentos com atividade de água (*aw*) baixa (0,83) (PIRONE-DAVIES et al., 2018; GERMANO; GERMANO, 2019).

A listeriose é de grande relevância em saúde pública em duas vertentes: de um lado, à gravidade da manifestação clínica, resultante do comprometimento do sistema nervoso central e do outro, pelo fato de a infecção acometer preferencialmente as gestantes, com nefastas consequências para os fetos. No Brasil, a doença provocada pela *L. monocytogenes* em seres humanos, veiculada por alimentos, ainda é pouco relatada, talvez por causa do elevado nível de subnotificação de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) ou das dificuldades de diagnóstico diferencial com outras infecções nervosas ou decorrentes da gravidez. Contudo, no Rio Grande do Sul, em 2003, pesquisas que envolveram 148 amostras provenientes de material abortado, placentas e restos fetais revelaram

a presença do agente em 34% das amostras analisadas, por meio de métodos imuno-histoquímicos (GERMANO; GERMANO, 2019).

A *L. monocytogenes* é isolada a partir de uma grande variedade de alimentos, entre os quais se destacam o leite cru ou pasteurizado, sorvete e queijos, produtos cárneos crus ou termoprocessados de diversas origens (bovina, ovina, caprina, suína e aves), peixes crus ou defumados e embutidos preparados a partir de carne crua fermentadas. Além desses, há casos ainda de produtos crus de origem vegetal, de origem marinha e refeições preparadas. Vale destacar que a bactéria também pode ser eliminada no leite dos animais infectados (GERMANO; GERMANO, 2019).

3.1.1 Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos

A indústria de laticínios no Brasil identifica-se, basicamente, pela exploração de quatro tipos de produtos: leite pasteurizado, leite em pó, queijos e produtos especiais (como iogurtes e sobremesas). Atualmente, os produtos lácteos fazem parte de uma grande parcela dentro do consumo de alimentos no Brasil e a demanda para o desenvolvimento e inovação de produtos é constante (LAZARO; BUENO, 2019).

Alimentos de origem animal, como os queijos, são a principal fonte de transmissão de bactérias que desencadeiam as DTAs. No Brasil, o padrão microbiológico de qualidade de queijos é definido tanto na produção, pela portaria n.º 146, de 7 de março de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1996), quanto no comércio varejista, pela RDC n.º 331, de 23 de dezembro de 2019 (BRASIL, 2019a) e a Instrução Normativa (IN) n.º 60 de 23 de dezembro de 2019 (BRASIL, 2019b). Em ambos os casos existe o controle da presença de patógenos de importância nesses produtos, além dos parâmetros microbiológicos de qualidade. A definição desses parâmetros teve como principal objetivo assegurar a qualidade e a segurança microbiológica de queijos destinados ao comércio nacional e internacional, adequando-os às exigências do Mercosul (GERMANO; GERMANO, 2019).

De acordo com o regulamento brasileiro citado acima, o padrão para *L. monocytogenes* não deve ser superior a 10^2 UFC/g ou mL para alimentos prontos para o consumo, num plano amostral de cinco unidades amostrais coletadas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente. Já os alimentos prontos para consumo destinados a lactentes ou para fins especiais, o padrão para *L. monocytogenes* é ausência num plano amostral de dez amostras coletadas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente (BRASIL, 2019a, 2019b).

Dentre os patógenos veiculados por alimentos que têm causado grande preocupação, nas últimas décadas, pode-se destacar a *L. monocytogenes*. A literatura científica registra diversos surtos de listeriose envolvendo o consumo de queijos macios, inclusive vários deles com casos fatais, de acordo com dados de autoridades europeias. A qualidade da matéria-prima para a fabricação desses produtos é muito importante, uma vez que o isolamento de *L. monocytogenes* em queijos fabricados com leite cru é mais frequente que em queijos fabricados com leite pasteurizado. Esse patógeno pode sobreviver durante todas as fases de processamento, maturação e estocagem. Em queijos moles, a *Listeria* spp. ainda ocorre na superfície e sua permanência na parte interna depende do pH do produto (GERMANO; GERMANO, 2019).

Embora ainda não tenha sido relatado caso ou surto de listeriose associado ao consumo de leite e produtos lácteos no Brasil, Oxaran et al. (2017) encontraram indícios de que a taxa de contaminação por *L. monocytogenes* está diminuindo nos laticínios nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. De 437 amostras, três amostras (0,7%) de varejo e apenas uma amostra (0,2%) dos laticínios foram positivas para *L. monocytogenes*. Amostras positivas demonstram que medidas de higiene devem ser mantidas rígidas nos estabelecimentos.

L. monocytogenes pode ser transmitida para o leite e queijo a partir do contato com fezes devido às práticas de higiene insuficientes ou pode ser transmitida diretamente do animal acometido de doenças como listeriose ou mastite (SCHODER et al., 2011). Porém, *L. monocytogenes* também pode contaminar os queijos após o processamento, dessa forma o risco de contaminação entre queijos de leite cru e de leite pasteurizado pode ser considerado similar (RUDOLF; SCHERER, 2001). Além disso, queijos de leite cru possuem uma microbiota complexa e altamente competitiva que acabam por inibir o desenvolvimento de *Listeria* spp. Outros autores verificaram a ausência de patógenos em queijos Minas frescal vendidos informalmente na cidade de Viçosa (MG) (MORAES et al., 2009).

3.1.2 Controle de *Listeria monocytogenes* na indústria

Há um interesse crescente na detecção de *L. monocytogenes*, sobretudo em indústrias de alimentos, devido à associação da bactéria presente no ambiente de processamento com o produto. Estudos baseados em DNA têm mostrado que certas cepas de *L. monocytogenes* se estabelecem em indústrias de alimentos, onde permanecem residentes por meses ou anos, constituindo fontes permanentes de contaminação (TOMPKIN, 2002). De acordo com o código alimentar estabelecido pela *Food and Drug Administration* (FDA) (2017), a *L. monocytogenes* é um dos perigos encontrados em queijos comercializados no varejo e requerem algumas medidas de controle importantes como:

cozimento, identificação de data de validade, conservação a frio, lavagem das mãos e prevenção de contaminação cruzada (RIVAS, 2021).

A persistência de cepas no ambiente industrial está relacionada com a adaptabilidade da bactéria e à provável formação de biofilmes (BAGGE-RAVN et al., 2003). Entretanto, não se sabe se essa persistência é resultado da adaptação de certos subtipos da bactéria, de limpeza e sanitização deficientes ou da habilidade do micro-organismo desenvolver tolerância a produtos utilizados no processo de higienização industrial (GRAM et al., 2007).

As grandes indústrias de alimentos vêm tentando minimizar o risco de veiculação de *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo, porém esse risco ainda existe. Com isso, pesquisas têm focado no desenvolvimento de medidas de controle dessa bactéria em indústrias processadoras de alimentos (DESTRO, 2006).

Uma vez que a entrada de *L. monocytogenes* na indústria pode ser contínuo, seu controle deve ser feito no seu interior com a aplicação de procedimentos de higienização e Boas Práticas de Fabricação (BPF) (TOMPKIN, 2002). Indústrias que processam alimentos de alto risco de contaminação por *L. monocytogenes* devem operar com programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e Procedimentos Padronizados de Higiene Operacional (PPHO) para reduzir a contaminação ambiental e minimizar a contaminação dos produtos, prevenindo assim casos de listeriose humana (ILSI, 2005).

Partindo da premissa de que as respostas de populações de micro-organismos em um ambiente definido são reprodutíveis, a ferramenta da microbiologia preditiva pode ser utilizada para avaliar a evolução do tamanho de uma população bacteriana de acordo com a contaminação inicial e o ambiente alimentar (ROSS; MCMEEKIN, 2003).

3.2 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva, através de modelos matemáticos, prediz efeitos no comportamento microbiano nos alimentos com relação a fatores como temperatura, quantidade de sal e conservantes (LÓPES et al., 2014). Essa ferramenta começou a ser considerada no início do século XX quando Bigelow, Esty e Meyer propuseram um modelo para descrever a cinética de morte bacteriana por calor e o aplicaram na indústria de alimentos (PRADHAN et al., 2019). Segundo Amaral e Potrich (2019), ao longo dos anos esse estudo obteve muitos progressos, por meio de novos modelos e análises multivariadas e, atualmente, o conhecimento sobre estatística aplicada, engenharia e microbiologia estão integrados com a ferramenta da microbiologia preditiva.

O desenvolvimento de *softwares* que utilizam modelos matemáticos é essencial à indústria de alimentos, pois além de fornecerem informações sobre os processos microbiológicos, auxiliam na estimativa de vida útil e permitem a simulação da influência de diversos fatores (SCHLEI et al., 2018).

O estabelecimento do modelo preditivo em alimentos envolve uma série de etapas que incluem: estudo detalhado do produto, escolha de um projeto experimental apropriado, coleta de dados, modelagem primária e secundária e validação do modelo. Dessa forma, o resultado é uma ferramenta segura e útil para avaliar as aplicações de ações corretivas durante o processamento de alimentos (LÓPES et al., 2014).

Os modelos matemáticos são usados para prever o comportamento (crescimento, inativação ou sobrevivência) e respostas dos micro-organismos em diferentes condições intrínsecas, como pH, a_w , cloreto de sódio, bem como condições extrínsecas, como temperatura e umidade relativa, ajustando a equação matemática os dados experimentais (PRADHAN et al., 2019).

Um banco de dados de modelos preditivos pode ser estabelecido, o que permite que o comportamento microbiano seja previsto sob condições não testadas especificamente nos experimentos originais. Classificam-se em três níveis: modelos primários, secundários e terciários; e são aplicados no intuito de melhorar a qualidade e segurança dos alimentos. O modelo primário está ligado às alterações microbiológicas de acordo com o tempo para o micro-organismo crescer, já o secundário, aos efeitos das condições ambientais, enquanto o terciário é considerado a junção dos dois níveis na forma de programa de computador, que simula o comportamento microbiano em diferentes condições (FAKRUDDIN; MAZUMDER; MANNAN, 2011; MATOS, 2014).

Para avaliar a segurança de alimentos relacionada ao risco de crescimento de *Listeria* spp. em “produtos alimentícios preparados e refrigerados”, temperatura, pH e atividade de água são os principais fatores que devem ser levados em consideração em modelos preditivos (BAJARD et al., 1996). Vários modelos são capazes de prever o tempo de latência (fase *lag*) e a velocidade de crescimento de *L. monocytogenes* (ou outros micro-organismos) em muitas matrizes alimentares a temperaturas constantes (ZWIETERING et al., 1990; BARANYI; ROBERTS, 1994) e um pequeno número de modelos também o fazem em um ambiente de temperatura dinâmica (condições não isotérmicas) (BARANYI et al., 1995; VAN IMPE et al., 1995).

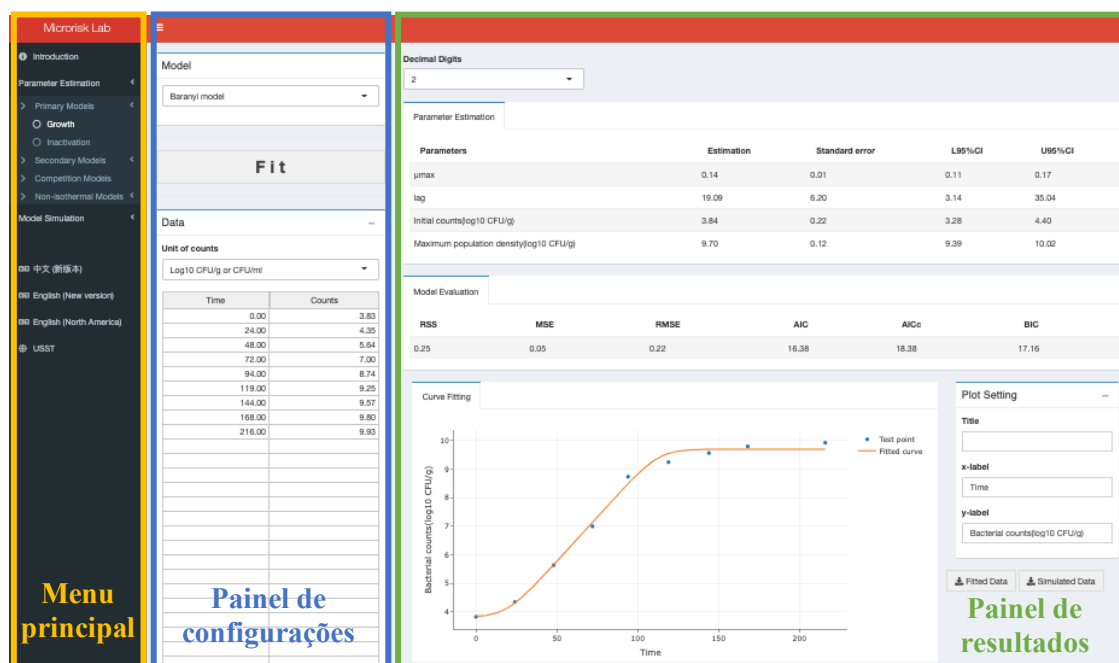
3.2.1 Software *MicroRisk Lab*

Muitos sistemas de modelagem interativa, chamados de modelos terciários, foram desenvolvidos nas últimas décadas (TENENHAUS-AZIZA; ELLOUZE, 2015). Dentre as ferramentas online gratuitas, destaca-se o DMFit online do *ComBase* (www.combase.cc), o *Food Spoilage and Safety Predictor* (FSSP), o *MicroHibro*, o *Prediction of Microbial Safety in Meat Products*, o *Baseline*, dentre outros *softwares* que podem ser facilmente acessados por meio de diferentes dispositivos conectados à internet, o que proporciona a capacidade de multiplataforma aos usuários. Recentemente, um sistema de modelagem online que integra modelos preditivos microbianos abrangentes, o *Microrisk Lab* (<https://microrisklab.shinyapps.io/english/>) foi desenvolvido para a estimação de parâmetros e simulação de modelos em microbiologia preditiva (LIU et al., 2021).

O *Microrisk Lab* foi projetado como um aplicativo da Web baseado em R com uma interface amigável para a realização de estimativa de parâmetros ou estudos de simulação de modelo em microbiologia preditiva. A linguagem de codificação R, um ambiente matemático de código aberto, pode ser executado em uma ampla variedade de sistemas de computador, incluindo Windows, UNIX e Mac OS (LIU et al., 2021).

A estrutura do *Microrisk Lab* é basicamente dividida no módulo “Estimativa” e “Simulação”. O módulo “Estimativa” foi focado em determinação dos parâmetros microbianos pelas observações experimentais sob diferentes condições. O módulo “Simulação” teve como objetivo simular as mudanças de concentração bacteriana sob diferentes temperaturas usando diferentes modelos preditivos integrados (LIU et al., 2021). A Figura 1 abaixo representa a visão geral do *layout* do *Microrisk Lab* e sua interface visual no computador.

Figura 1 - Visão geral do *layout* do *Microrisk Lab* e sua interface visual em computador conectado à internet.



Fonte: elaborada pela autora (2022).

4. METODOLOGIA

4.1 DADOS DE CRESCIMENTO

Os dados de crescimento em diferentes temperaturas foram obtidos do navegador *ComBase* (www.combase.cc), utilizando a categoria de alimento “cheese”, o micro-organismo “*Listeria monocytogenes/innocua*” e a faixa de temperatura entre 5 e 25 °C. Foram selecionados dados do crescimento (\log_{10} UFC/g) de *L. monocytogenes* em queijo branco fatiado em cinco temperaturas de armazenamento: 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C e 25 °C. Os dados foram reportados da pesquisa de Uhlich e colaboradores (2006), intitulada “*Effect of storage temperature on the growth of Listeria monocytogenes on queso blanco slices*”, publicada no periódico “*Journal of Food Safety*”.

4.2 MODELAGEM PRIMÁRIA

O modelo matemático primário selecionado está representado pelas Equações 1 a 3, sendo um modelo sigmoide com função de ajuste, Baranyi e Roberts (Eqs. 1, 2 e 3) (BARANYI; ROBERTS, 1994). O modelo foi ajustado às curvas experimentais de *L. monocytogenes* em fatias de queijo branco em diferentes temperaturas.

$$Y(t) = y_0 + \mu_{m\acute{a}x}A(t) - \ln \left\{ 1 + \frac{e^{\mu_{m\acute{a}x}A(t)} - 1}{e^{y_{m\acute{a}x} - y_0}} \right\} \quad (1)$$

$$A(t) = t + \left(\frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \right) \ln \left[e^{(-\mu_{m\acute{a}x}t)} + e^{(-\mu_{m\acute{a}x}t_{lag})} - e^{(-\mu_{m\acute{a}x}t - \mu_{m\acute{a}x}t_{lag})} \right] \quad (2)$$

$$h_0 = \mu_{m\acute{a}x}t_{lag} \quad (3)$$

Nas equações, $Y(t)$ é o logaritmo da concentração microbiana N (UFC/g) no tempo t (horas), ou seja, $y(t) = \log [N(t)]$. O parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima específica de crescimento (h^{-1}); t_{lag} é a duração da fase de latência (h); y_0 é o logaritmo da concentração microbiana inicial, $y_0 = \log (N_0)$; $y_{m\acute{a}x}$ é o logaritmo da população máxima, $y_{m\acute{a}x} = \log (N_{m\acute{a}x})$; h_0 é o parâmetro relacionado ao estado fisiológico das células (adimensional); $A(t)$ é a função de ajuste do modelo Baranyi e Roberts.

4.3 MODELAGEM SECUNDÁRIA

Os modelos secundários logarítmico, linear, raiz quadrada e tipo Arrhenius (Equações 4, 5, 6 e 7, respectivamente) foram usados para descrever o efeito da temperatura na velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), em que a e b são parâmetros empíricos, T é a temperatura de armazenamento ($^{\circ}\text{C}$) e T_{min} é a temperatura teórica mínima de crescimento ($^{\circ}\text{C}$).

$$\mu_{m\acute{a}x} = \ln T + b \quad (4)$$

$$\mu_{m\acute{a}x} = aT + b \quad (5)$$

$$\sqrt{\mu_{m\acute{a}x}} = a(T - T_{min}) \quad (6)$$

$$\ln \mu_{m\acute{a}x} = a(1/T) + b \quad (7)$$

4.4 ANÁLISES NUMÉRICAS

Os ajustes do modelo primário aos dados experimentais de crescimento de *L. monocytogenes* em fatias de queijo nas temperaturas de armazenamento entre 5 $^{\circ}\text{C}$ e 25 $^{\circ}\text{C}$ foram realizados no *software MicroRisk Lab online* versão 1.0. O ajuste foi realizado em apenas uma etapa, obtendo os parâmetros $\mu_{m\acute{a}x}$, t_{lag} , y_0 e $y_{m\acute{a}x}$.

Os valores estimados, os erros padrão e os intervalos de confiança inferior e superior de 95% (Equação 8) foram determinados pelo pacote R de “*stats*” e “*nlstool*”.

$$\left\{ \begin{array}{l} L95\%IC = \hat{\beta} - t_{95\%,df} \times MSE \times \hat{B} \\ U95\%IC = \hat{\beta} + t_{95\%,df} \times MSE \times \hat{B} \\ t_{95\%,df} = t_{95\%,\infty} \approx 1,96 \end{array} \right. \quad (8)$$

Em que, $\hat{\beta}$ é o parâmetro estimado; MSE é a soma média do erro quadrado; \hat{B} é o inverso da matriz de segundas derivadas da função log-probabilidade (*log-likelihood*) em função de β avaliada nas estimativas dos parâmetros $\beta = \hat{\beta}$; df é grau de liberdade, que é assumido infinito; $t_{95\%,df}$ é o valor da distribuição *t* para 95% de confiança para o número especificado de df.

Os modelos secundários foram ajustados no programa Microsoft Excel[®]. As equações dos modelos secundários foram realizadas em planilhas do Excel[®].

4.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO MODELO PRIMÁRIOS E DOS MODELOS SECUNDÁRIOS

Vários indicadores estatísticos foram utilizados para avaliar e comparar a qualidade do ajuste entre os valores observados e preditos, como a soma da raiz média do erro quadrático (RMSE) (Eq. 9) (MCKELLAR; LU; RATKOWSKY, 2003), fator bias (F_B) (Eq. 10) (ROSS, 1996), fator de exatidão (F_E) (Eq. 11) (ROSS, 1996) e o coeficiente de determinação (R^2) (Eq. 12) RAWLINGS; PANTULA; DICKEY, 2001).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (valor_{predito} - valor_{observado})^2}{n}} \quad (9)$$

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

$$fator\ de\ exatidão = 10^{\left(\frac{\sum |\log(valor_{predito}/valor_{observado})|}{n}\right)} \quad (11)$$

$$R^2 = \frac{\sum (valor_{predito} - valor_{observado\ médio})^2}{\sum (valor_{observado} - valor_{observado\ médio})^2} \quad (12)$$

Em que n é o número de dados amostrais. O desempenho do ajuste dos modelos secundários aos dados de $\mu_{máx}$ em função da temperatura de armazenamento foi avaliado utilizando o R^2 (Eq. 12).

4.6 MODELO NÃO ISOTÉRMICO

Para a predição do crescimento de *L. monocytogenes* em queijo branco em condições de oscilações de temperaturas (condições não isotérmicas), foi utilizada a equação diferencial do modelo de Baranyi e Roberts (Equações 13 e 14).

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \left[\frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \right] \{1 - \exp[y(t) - y_{m\acute{a}x}]\} \quad (13)$$

$$\frac{dQ(t)}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \quad (14)$$

Em que, $y(t)$ é o logaritmo da concentração microbiana N (UFC/g) no tempo t (horas), ou seja, $y(t) = \log [N(t)]$. $Q(t)$ é a função de ajuste, considerada como o estado fisiológico das células (BARANYI; ROBERTS, 1994).

As Equações 15 e 16 descrevem as condições iniciais utilizadas para resolver as Equações diferenciais 13 e 14.

$$Q(0) = Q_0 \quad (15)$$

$$y(0) = y_0 \quad (16)$$

Em que, y_0 representa o logaritmo da concentração microbiana inicial N_0 , ou seja, $y(0) = \log [N_0]$; Q_0 é considerado como o valor do estado fisiológico inicial das células, que relaciona-se com o parâmetro h_0 , por meio da Equação 17.

$$Q_0 = -\log[\exp(h_0) - 1] \quad (17)$$

As condições não isotérmicas utilizadas para a simulação do crescimento de *L. monocytogenes* em fatias de queijo branco estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições não isotérmicas utilizadas para a predição do crescimento de *L. monocytogenes* em fatias de queijo branco.

Condição não isotérmica	Tempo e temperatura de simulação (°C)
CN ₁	5 °C [40 h], 10 °C [40 h], 15 °C [40 h] e 20 °C [20 h]
CN ₂	25 °C [20 h], 20 °C [20 h], 15 °C [20 h] e 10 °C [50 h]

Fonte: elaborada pela autora (2022).

Outra simulação da predição do crescimento nas condições não isotérmicas representadas na Tabela 1 foi realizada, utilizando a ferramenta “Broth models” (Modelos caldo de cultivo), selecionando a opção “Dynamic growth” (crescimento dinâmico) e o micro-organismo “*Listeria monocytogenes/innocua*” na base de dados do *ComBase*. Para isso, foram utilizados os dados de concentração inicial do crescimento (\log_{10} UFC/g), o pH, a *aw* e a média dos valores do estado fisiológico das células (h_0), obtidos pelo ajuste do modelo primário de Baranyi e Roberts, para cada temperatura estudada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

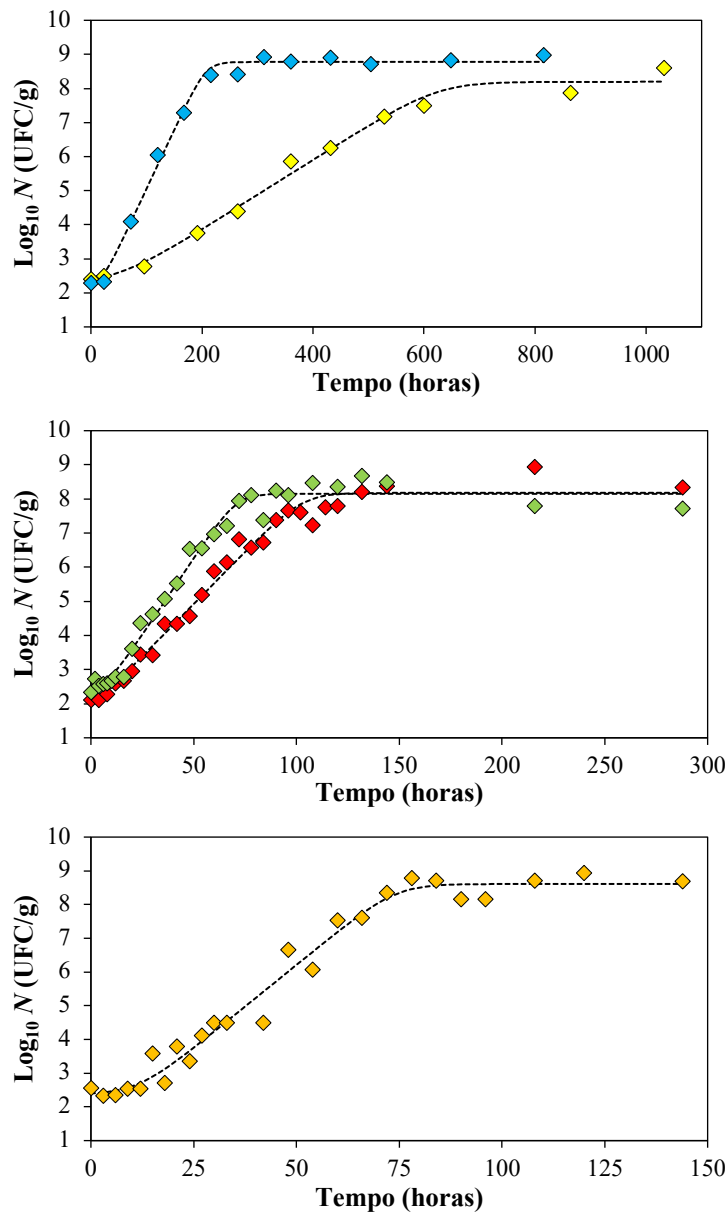
Os dados experimentais utilizados neste trabalho foram obtidos da pesquisa de Uhlich e colaboradores (2006). Os autores avaliaram o crescimento de *L. monocytogenes* em fatias de queijo branco de estilo hispânico, conhecido como “Queso Blanco”. Esse tipo de queijo é frequentemente produzido de forma artesanal, em casas particulares, com leite cru, dificultando o cumprimento das regulamentações de segurança de alimentos. Em 2006, os autores afirmaram que esforços de educação culturalmente apropriados devem ser expandidos para evitar tais problemas no futuro.

As curvas de crescimento foram obtidas em fatias de queijo branco para avaliar a temperatura de incubação no crescimento de *L. monocytogenes* a 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C e 25 °C, e o modelo de Baranyi e Roberts foi ajustado aos dados experimentais utilizando o *software MicroRisk Lab*, apresentando um bom ajuste em todas as condições estudadas (Figura 2).

Independente da temperatura de crescimento, as contagens iniciais obtidas foram, em média, de 2,3 log₁₀ UFC/g, indicando que as curvas de crescimento foram construídas partindo, aproximadamente, do mesmo ponto. Esse valor é próximo ao limite proposto de contagens de *L. monocytogenes* para alimentos prontos para o consumo, de acordo com a IN nº. 60, de 23 de dezembro de 2019, que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2019b).

Em pesquisa realizada por Ryser e Marth (1999), o leite cru foi identificado como uma fonte significativa de *L. monocytogenes*, com 1,6 a 7,0% das amostras com resultados positivos nos Estados Unidos. Embora já se tenha passado mais de 20 anos, o uso de leite cru continua sendo um risco para qualquer queijo, pois a sua produção a partir de leite pasteurizado ainda pode representar risco de listeriose, uma vez que a contaminação também pode ocorrer durante o processamento e/ou pós-processamento.

Figura 2 - Curvas de crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo branco fatiado e os ajustes do modelo de Baranyi e Roberts (linhas tracejadas) aos dados experimentais nas temperaturas de (A) 5 °C (símbolos amarelos) e 10 °C (símbolos azuis), (B) 15 °C (símbolos vermelhos) e 20 °C (símbolos verdes) e (C) 25 °C (símbolos laranjas) de armazenamento.



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Os parâmetros de crescimento calculados de *L. monocytogenes* incubado em queijo branco nas temperaturas avaliadas são mostrados na Tabela 2. *L. monocytogenes* foi capaz de crescer em todas as temperaturas, mesmo sob refrigeração (5 °C e 10 °C). O crescimento foi relativamente rápido na menor temperatura de armazenamento (5 °C), com valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ de 0,02 h⁻¹. Neste trabalho, o queijo branco apresentou valor de pH de 6,8, considerando uma acidez relativamente baixa e alto teor

de umidade (48%), de acordo com as informações obtidas dos dados de crescimento no *ComBase* (www.combase.cc). Esses valores justificam o rápido crescimento de *L. monocytogenes* em queijo branco, nesta pesquisa, pois o pH favoreceu o seu crescimento, independente da temperatura estudada. Scolforo (2018) ajustou o modelo de Baranyi e Roberts para estudar o crescimento de *L. monocytogenes* em meio de cultivo (pH 7) em diferentes temperaturas. A autora encontrou valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ de $0,0233 \text{ h}^{-1}$ e $0,2224 \text{ h}^{-1}$ para $8,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente, valores pr3ximos aos relatados neste trabalho (Tabela 2). Esses resultados demonstram que o queijo branco, produzido com leite cru, 3 um excelente meio de cultivo para o crescimento de *L. monocytogenes*.

Tabela 2 - Parâmetros de crescimento (\pm DP) estimados pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais de *Listeria monocytogenes* em fatias de queijo branco armazenado a $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Parâmetros e intervalos de confiança					
	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	IC95%	t_{lag} (h)	IC95%	$y_{m\acute{a}x}$ (\log_{10} UFC/g)	IC95%
5	$0,02 \pm 0,00$	(0,02; 0,03)	$56,43 \pm 36,35$	(-29,53; 142,39)	$8,20 \pm 0,19$	(7,75; 8,64)
10	$0,08 \pm 0,01$	(0,07; 0,09)	$17,49 \pm 10,78$	(-6,89; 41,87)	$8,78 \pm 0,08$	(8,60; 8,96)
15	$0,14 \pm 0,01$	(0,13; 0,16)	$2,38 \pm 6,09$	(-10,21; 14,97)	$8,18 \pm 0,13$	(7,90; 8,45)
20	$0,21 \pm 0,01$	(0,18; 0,23)	$6,83 \pm 3,72$	(-0,85; 14,51)	$8,15 \pm 0,10$	(7,94; 8,36)
25	$0,23 \pm 0,02$	(0,19; 0,26)	$11,43 \pm 3,94$	(3,23; 19,63)	$8,61 \pm 0,16$	(8,27; 8,95)

IC95%: intervalo de confiança inferior e superior a 95%.

Fonte: elaborada pela autora (2022).

Ao observar os parâmetros da Tabela 2, 3 poss3vel verificar que a temperatura 3 um fator importante no crescimento dos micro-organismos, com um aumento dos valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ e, conseqüentemente, diminuiç3o do tempo da fase *lag* (t_{lag}). Foi poss3vel observar que os valores do parâmetro t_{lag} diminuíram com o aumento da temperatura, com valores variando entre 2,38 h e 56,43 h, com exceç3o das temperaturas de 20 e $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, que atingiram valores de 6,83 h e 11,43 h, respectivamente, valores maiores do que o encontrado para $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (2,38 h). Essa diferenç3a pode ter ocorrido devido ao formato sigmoidal das curvas de 20 e $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 2B e C). O contr3rio ocorreu com a velocidade de crescimento, em que foi poss3vel observar um aumento em temperaturas mais elevadas, variando de $0,02 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ a $0,23 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ nas temperaturas de 5 e $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Assim, destaca-se a import3ncia de manter toda a cadeia do frio, com a finalidade de aumentar o tempo da fase *lag* e de retardar ao m3ximo a fase exponencial de crescimento, evitando atingir valores cr3ticos de patogenicidade, mesmo que esse pat3geno seja capaz de crescer sob refrigeraç3o. Em estudo

realizado no Ceará, sobre a incidência de *L. monocytogenes* em queijo tipo coalho, produzido industrialmente e comercializado sob refrigeração, demonstrou que das 84 amostras examinadas, 19% estavam contaminadas pelo patógeno (BRANCO et al., 2003).

O valor médio da população máxima atingida ($y_{m\acute{a}x}$) foi de 8,38 log₁₀ UFC/g, indicando o ótimo crescimento de *L. monocytogenes* em queijo branco fatiado. Esses resultados indicam que, a uma temperatura menos desejável, como 10 °C, o número de *L. monocytogenes* atingirá ≥ 8 log₁₀ UFC/g em 8 dias. De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (em inglês: *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC) (CDC, 2017), em março de 2017 foram relatadas oito pessoas infectadas em quatro estados dos Estados Unidos da América (EUA), sendo que duas morreram pela ingestão de queijo feito com leite cru.

Recentemente, em fevereiro de 2021, o CDC, autoridades de saúde pública e reguladoras e a FDA) dos Estados Unidos começaram a coletar diferentes tipos de dados para investigar um surto multiestadual de infecções por *L. monocytogenes*. Dados epidemiológicos e laboratoriais mostraram que um total de 13 pessoas infectadas com a cepa do surto de *L. monocytogenes* foram relatadas em quatro estados. Doze pessoas eram hispânicas e sete pessoas eram do sexo feminino. Doze pessoas foram hospitalizadas e uma morte foi relatada no Estado de Maryland - EUA. Quatro pessoas adoeceram durante a gravidez, resultando em duas perdas gestacionais e um parto prematuro; a quarta pessoa permaneceu grávida após a recuperação. Das 11 pessoas entrevistadas, oito (73%) relataram consumir queijos frescos e macios de estilo hispânico. Entre as oito pessoas, sete (88%) relataram comer queijo fresco de quatro marcas especificamente relatadas (CDC, 2021).

Ao avaliar os índices estatísticos do desempenho do modelo de Baranyi e Roberts obtidos pelo *software MicroRisk Lab* (Tabela 3), pode-se afirmar que o modelo apresentou ótimo desempenho para descrever o crescimento de *L. monocytogenes* em queijo branco nas cinco temperaturas avaliadas. Em estatística, os índices RMSE, F_B e F_E são mais frequentemente usados para seleção de modelos. Ao calcular e comparar os valores desses índices de diferentes modelos, é possível indicar aquele que melhor se ajusta aos dados experimentais. Neste trabalho, apenas o modelo de Baranyi e Roberts foi utilizado, assim, os valores desses índices foram comparados para avaliar o desempenho do modelo para cada temperatura estudada.

Tabela 3 - Índices estatísticos de desempenho do modelo de Baranyi e Roberts ajustado aos dados experimentais de *Listeria monocytogenes* em fatias de queijo branco armazenado a 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C e 25 °C.

Temperatura (°C)	Índices estatísticos			
	RMSE	F _B [*]	F _E [*]	R ^{2*}
5	0,620	1,001	1,027	0,989
10	0,500	1,002	1,027	0,996
15	0,740	1,003	1,042	0,978
20	0,720	1,002	1,042	0,984
25	0,940	1,003	1,066	0,978

*Resultado não mostrado no *MicroRisk Lab*.

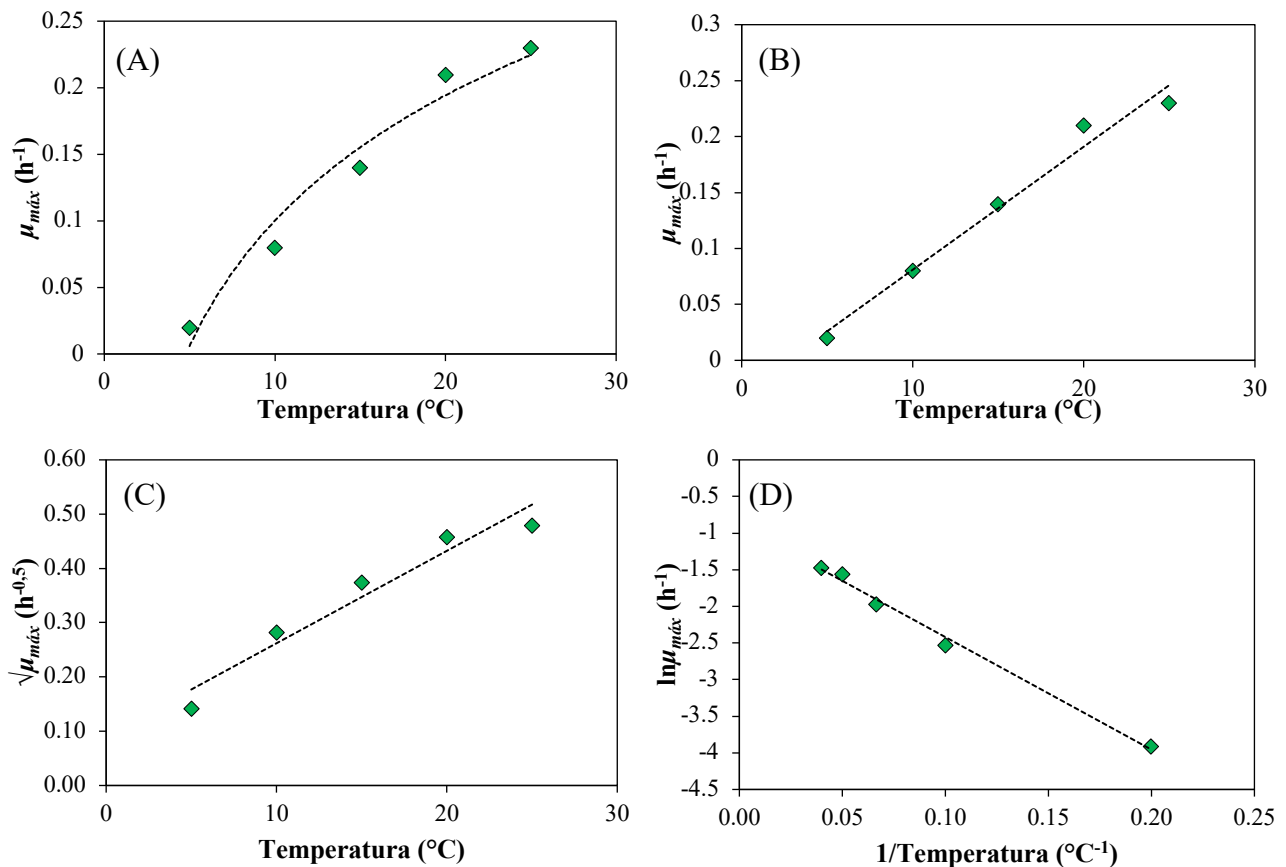
Fonte: elaborada pela autora (2022).

Os resultados dos ajustes obtidos neste trabalho corroboram com o estudo realizado por Tiwari et al. (2014), ao avaliarem a influência da temperatura de armazenamento, do pH e da atividade da água sobre *L. monocytogenes* em queijo fabricado com leite cru e com leite pasteurizado em diferentes temperaturas de armazenamento (4, 10 e 15 °C). Os autores indicaram que os modelos preditivos de Baranyi, Gompertz Modificado e Logístico podem auxiliar na otimização das condições intrínsecas do alimento e ao mesmo tempo na redução do crescimento de *L. monocytogenes*.

Os modelos secundários que melhor se ajustaram aos dados do parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts para os dados de crescimento de *L. monocytogenes* em queijo fresco fatiado são apresentados na Figura 3 e as equações dos modelos com seus parâmetros ajustados são apresentadas na Tabela 4.

Ao analisar a Figura 3, é possível verificar de forma qualitativa que os modelos apresentaram bons ajustes aos dados experimentais, sendo que os modelos secundários apresentados na Tabela 4 podem ser usados para prever a velocidade específica máxima de crescimento de *L. monocytogenes* nas condições estudadas e em condições que não extrapolem a temperatura no intervalo entre 5 °C e 25 °C.

Figura 3 - Modelos secundários que representam o efeito da temperatura no parâmetro velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) de *Listeria monocytogenes* em fatias de queijo branco. (A) modelo logarítmico, (B) modelo linear, (C) modelo da raiz quadrada e (D) modelo tipo Arrhenius. Os dados representam a velocidade específica máxima de crescimento obtida pelo modelo de Baranyi e Roberts. As linhas tracejadas representam os ajustes dos modelos secundários aos dados.



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Os modelos tipo Arrhenius, linear e logarítmico apresentaram valores de R^2 acima de 0,95, com maior destaque para o modelo tipo Arrhenius ($R^2 = 0,994$) e linear ($R^2 = 0,978$). Os valores de R^2 próximos a 1,0 são considerados como um ajuste satisfatório (ROSS, 1996). O modelo da Raiz quadrada apresentou um menor desempenho, com um valor de R^2 igual a 0,941, embora possa ser considerado um bom ajuste, pois os dados de crescimento de *L. monocytogenes* foram obtidos em matriz alimentar (queijo).

Tabela 4 - Equações dos modelos secundários que representam a influência da temperatura do no parâmetro velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) de *Listeria monocytogenes* em fatias de queijo branco.

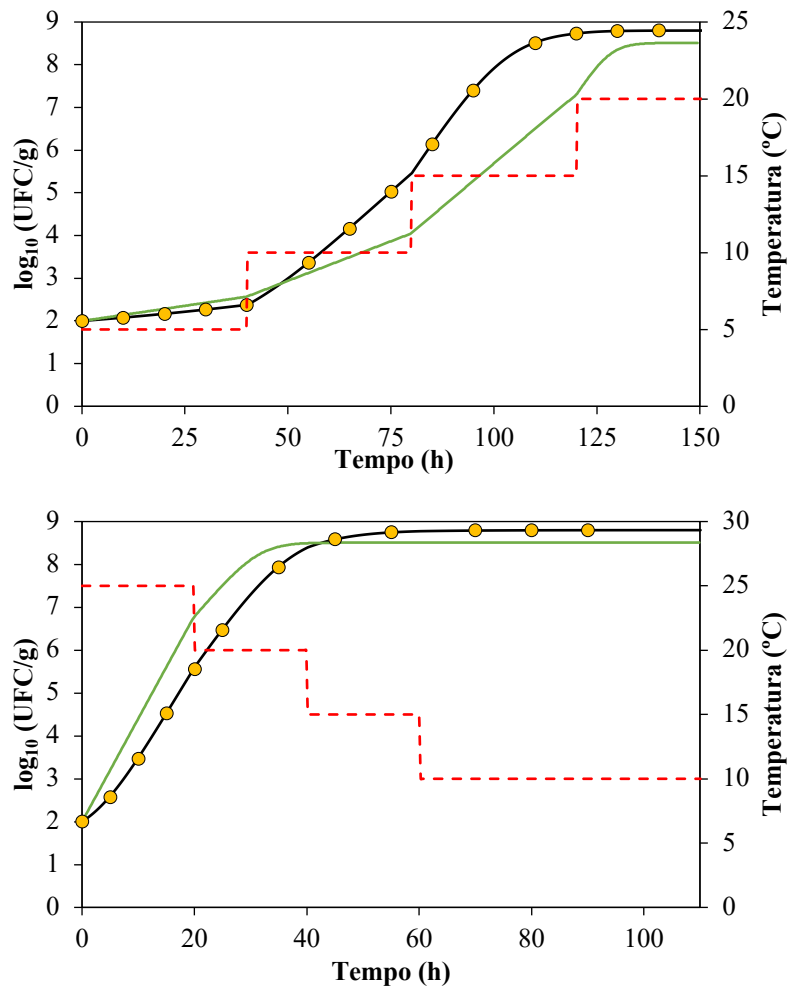
Modelo secundário	Equação	R ²
Logarítmico	$\mu_{m\acute{a}x} = 0,136 \times \ln (T) - 0,2127$	0,964
Linear	$\mu_{m\acute{a}x} = 0,011 \times (T) - 0,029$	0,978
Raiz quadrada	$\sqrt{\mu_{m\acute{a}x}} = 0,017 \times (T + 5,39)$	0,941
tipo Arrhenius	$\ln \mu_{m\acute{a}x} = -15,357 \times (1/T) - 0,8842$	0,994

Fonte: elaborada pela autora (2022).

Os modelos secundários juntamente com os modelos primários podemos ser utilizados para prever o crescimento de *L. monocytogenes* em queijo branco na faixa de temperatura estudada. Assim, a equação do modelo secundário tipo Arrhenius e o valor médio de h_0 foram usados para a predição do crescimento de *L. monocytogenes* em queijo branco em duas condições hipotéticas de armazenamento não isotérmicos, a partir da resolução da equação diferencial do modelo de Baranyi e Roberts, por meio do método de Runge-Kutta 4ª ordem. Além disso, foi a predição do crescimento em condições não foi realizada utilizando a ferramenta disponível na base de dados do *ComBase*, considerando o crescimento *L. monocytogenes* em meio de cultivo nas condições de pH de 6,8, a_w de 0,971 e concentração inicial de 2 log₁₀ UFC/mL.

A primeira condição considerou o armazenamento refrigerado a 5 °C por 40 h, seguido de um aumento de temperatura com uma amplitude de 5 °C, ou seja, aumento para 10, 15 e 20 °C. Já na segunda condição, simulou-se o queijo armazenado a temperatura ambiente (25 °C) seguido de um resfriamento lento com amplitude de 5 °C, ou seja, 20, 15 e 10 °C. Essas simulações visaram representar condições reais de armazenamento de produtos lácteos, com a interrupção da cadeia do frio, como por exemplo: problemas operacionais no transporte refrigerado dos alimentos, tempo de espera dos produtos a serem alocados nas gondolas dos supermercados, possíveis desligamentos dos refrigeradores dos supermercados (a fim de economizar energia), armazenamento inadequado nos refrigeradores domésticos, entre outras. As simulações da variação de temperatura, as predições do crescimento e a simulação dos dados experimentais estão representadas na Figura 4.

Figura 4 – Simulação da predição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo branco em diferentes condições de armazenamento não isotérmico, (A) 5-10-15-20 °C e (B) 25-20-15-10 °C. Em todos os gráficos, a linha contínua preta representa a simulação da predição do modelo de Baranyi e Roberts, a linha contínua verde representa a simulação da predição utilizando o *ComBase*, a linha tracejada em vermelho representa a simulação do perfil de temperatura e os símbolos em amarelo representam uma simulação dos dados de crescimento de *Listeria monocytogenes*.



Fonte: elaborada pela autora (2022).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 4, é possível observar que o aumento gradual da temperatura (Figura 4A), de 5 a 20 °C, possui menor influência no crescimento de *L. monocytogenes* quando comparado com a condição de temperatura de 25 a 10 °C (Figura 4B), quando a temperatura é decrescente, exemplificando uma possível falha no início da cadeia do frio do produto, o qual atinge uma concentração microbiana maior em menor tempo. Por exemplo, na condição da Figura 4A, em 40 horas a concentração microbiana é de 2,37 \log_{10} UFC/g, enquanto na condição representada na Figura 4B, nesse mesmo tempo, *L. monocytogenes* encontra-se na fase

estacionária ($8,5 \log_{10}$ UFC/g), demonstrando que a refrigeração não é capaz de recuperar a segurança do alimento que apresenta elevados níveis de contaminação.

Com relação à simulação do crescimento de *L. monocytogenes* em meio de cultivo, utilizando o *ComBase*, pode-se verificar que, na condição de temperatura crescente, o modelo apresenta uma predição semelhante quando a temperatura foi de 5 °C e, na medida que a temperatura aumentou, a predição ficou abaixo da realizada com os dados de crescimento em queijo branco, representando uma “falha perigosa”, uma vez que o crescimento de *L. monocytogenes* no queijo pode ser superior ao previsto pelo modelo em meio de cultivo. Enquanto na simulação do crescimento em temperatura decrescente, a predição em meio de cultivo foi superior à predição do crescimento em queijo, sendo considerada uma “falha segura”. Esses resultados ressaltam a importância na manutenção da cadeia do frio. No entanto, o modelo preditivo precisa ser validado em laboratório, a partir de simulações do crescimento desse micro-organismo em condições de flutuação de temperatura de armazenamento e os índices estatísticos precisam ser aplicados para avaliar o desempenho do modelo ao prever o crescimento microbiano.

6. CONCLUSÃO

O modelo primário de Baranyi e Roberts apresentou bom desempenho para descrever o crescimento da *L. monocytogenes* em queijo branco fatiado, com a estimativa dos parâmetros de crescimento obtida pelo *software Microrisk Lab*. Além disso, os modelos secundários descreveram bem a influência da temperatura na velocidade específica máxima de crescimento de *L. monocytogenes*, com destaque para o modelo tipo Arrhenius. Assim, pode-se concluir que a aplicação de modelos preditivos e *softwares* de fácil utilização podem ser usados para orientar os proprietários de restaurantes, estabelecimentos e indústria de laticínios, para preparar e armazenar adequadamente os queijos e outros produtos relacionados, para evitar o crescimento de *L. monocytogenes*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, L. S.; POTRICH. O uso de ferramentas da microbiologia preditiva para análise multivariada em experimentos. In: Workshop de Inovação, Pesquisa, Ensino e Extensão, 2019, São Carlos, SP. Anais [ISSN 2525-9377] São Carlos, 2019.

BAGGE-RAVN, D. et al. Comparison of sodium hypochlorite-based foam and peroxyacetic acid-base for sanitizing procedures in a salmon smokehouse: survival of general microflora and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 4, p. 592-598, 2003.

BAJARD, S. et al. The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 201-211, 1996.

BARANYI, J. et al. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, p. 61-75, 1995.

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

BRANCO, M. A. A. C. et al. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, p. 393-408, 2003.

BRASIL. Instrução Normativa N° 60, de 23 de dezembro de 2019, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2019b.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria n° 146/96, de 07/03/96. Regulamento Técnico Geral para Fixação de Requisitos Microbiológicos de Queijos. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1996.

BRASIL. Resolução RDC N° 331, de 23 de dezembro de 2019, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2019a.

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, 2017.

CARLIN, F.; PECK, M. W. Growth of and toxin production by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in cooked puréed vegetables at refrigeration temperatures. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 8, p. 3069-3072, 1996.

CASEMIRO, I. P.; ZAMBIAZI, R. C.; VENDRAMINE, A. L. A. Sous-vide: aplicações e qualidade de vegetais. **Revista alimento, ciência, tecnologia e meio ambiente**, v. 1, n. 1, p. 70-82, 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Listeria* Outbreaks. 2017.

Centers for Disease Control and Prevention. *Listeria* Outbreak Linked to Queso Fresco Made by El Abuelito Cheese Inc. [Internet]. Washington, D.C.: Centers for Disease Control and Prevention; 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/hispanic-soft-cheese-02-21/details.html>

D'AMICO, D. J. et al. Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont effect of farm characteristics and practices. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 134-147, 2010.

DESTRO, M. T. ***Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de alimentos: da produção primária ao consumidor final.** 2006. 74f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FAKRUDDIN, M. D.; MAZUMDER, R. M.; MANNAN, K. S. B. Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. **Ceylon Journal of Science**, n. 40, v. 2, p. 121-131, 2011.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 55, p. 476-511, 1991.

FDA. Food Code. US Public health service, [s. l.], v. 0001, n. 1, p. 237–304, 2017.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. Barueri: Manole, 2019. 864 p.

GRAM, L. et al. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 10, p. 1165-1171, 2007.

HA, J. et al. Evaluation of near-infrared pasteurization in controlling *Escherichia coli* 0157:17, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat sliced ham: **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 6458-6465, 2012.

ILSI. Research foundation/risk science institute, expert panel on *Listeria monocytogenes* in foods. Achieving continuous improvement in reduction in foodborne listeriosis – a risk-based approach. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 9, p. 1932-1994, 2005.

KAMIMURA, B. A. et al. Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms. **Food Microbiology**, v. 89, 2020.

LAZARO, A. A.; BUENO, S. M. Desenvolvimento e análise sensorial de produtos lácteos produzidos com kéfir. **Revista Científica**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2019.

LÓPES, F. N. A. et al. Predictive Microbiology: A Valuable Tool in Food Safety and Microbiological Risk Assessments. In: **Practical Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions**. 1. Ed. Córdoba, Spain, p. 517-534, 2014.

LUI, Y. et al. Microrisk Lab: An Online Freeware for Predictive Microbiology. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 18, p. 607-615, 2021.

MATOS, L. R. **Microbiologia Preditiva aplicada à análise de amostras de carne de vaca e porco**. 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

MCINTYRE, L. et al. Listerioseis outbreaks in British Columbia, Canada, caused by soft ripened cheese contaminated from environmental sources. **BioMed Research International**, p. 1-12, 2015.

MCKELLAR, R.; LU, X.; RATKOWSKY, D. A. Model fitting and uncertainty. In: R. McKellar, & X. Lu (Eds.), **Modeling Microbial Responses in Foods** (p. 151-196). Boca Raton: CRC Press., 2003.

MORAES, P. M. et al. Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 6, n. 2, p. 245-249, 2009.

MURRU, N. et al. *Listeria monocytogenes* survival during production and storage of water buffalo Mozzarella cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, p. 356-361, 2018.

OXARAN, V. et al. *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. **Food Microbiology**, 2017.

PIRONE-DAVIES, C. et al. Genes significantly associated with lineage II food isolates of *Listeria monocytogenes*. **BMC Genomics**, v. 19, p. 708, 2018.

PRADHAN, A. K; MISHRA, A.; PANG, H. Microbiologia predictiva e avaliação de risco microbiano. **Microbiologia Alimentar: Fundamentos e fronteiras**, 5. Ed. Washington, DC, p. 989-1006, 2019.

RAWLINGS, J. O.; PANTULA, S. G.; DICKEY, D. A. Chapter 7 Model development variable selection. In: Applied regression analysis: a reserch tool. **Springer Science & Business Media**, p. 205-234, 2001.

RIVAS, P. M. **Contaminação cruzada por *Listeria monocytogenes* durante fatiamento mecânico de queijo mussarela e predição de seu comportamento durante armazenamento em**

refrigeração. 2021. 57f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ROSS, T.; McMEEKIN, T. A. Modeling microbial growth within food safety risk assessments. **Risk Analysis**, v. 23, p. 179-197, 2003.

RÜCKERL, I. et al. *Listeria monocytogenes* in a cheese processing facility: learning from contamination scenarios over years of sampling. **International Journal of Food Microbiology**, v. 189, p. 98-105, 2014.

RUDOLF, M.; SCHERER, S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 91-98, 2001.

RYSER, E. T; MARTH, E. H. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. Marcel Dekker, Inc., New York, 1999.

SCHLEI, K. P. et al. Microbiologia Preditiva: aspectos gerais e tendências. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 10, p. 52-68, 2018.

SCHODER, D. et al. Important vectors for *Listeria monocytogenes* transmission at farm dairies manufacturing fresh sheep and goat cheese from raw milk. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 6, p. 919-924, 2011.

SCOLFORO, C. Z. **Modelagem preditiva do crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* em co-cultura com *Enterococcus faecalis***. 2018. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

TIENUNGOON, S. et al. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4979-4987, 2000.

TILOCCA, B. et al. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. **Journal of Proteomics**, v. 210, 2020.

TIWARI, U. et al. Modelling the interaction of storage temperature, pH, and water activity on the growth behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurized semi-soft rind washed milk cheese during storage following ripening. **Food Control**, v. 42, p. 248-256, 2014.

TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 4, p. 709-725, 2002.

VAN IMPE, J. F. et al. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p. 227-249, 1995.

YOON, Y. et al. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, v. 63, p. 201-215, 2016.

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