

DAIENE SILVA DA COSTA

**MODELAGEM PROBABILÍSTICA DO CRESCIMENTO DE
Listeria monocytogenes EM FUNÇÃO DO EFEITO DE pH,
TEMPERATURA E TEMPO DE ESTOCAGEM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

Costa, Daiene Silva da, 1991-
C837m Modelagem probabilística do crescimento de *Listeria*
2016 *monocytogenes* em função do efeito de pH, temperatura e tempo
de estocagem / Daiene Silva da Costa. – Viçosa, MG, 2016.
x, 59f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.53-59.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Ácido acético - Pesos e
medidas. 3. Ácido cítrico - Pesos e medidas. 4. Ácido láctico -
Pesos e medidas. 5. Micro-organismos. 6. Microbiologia -
Cultura e meios de cultura. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa
de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
II. Título.

CDD 22 ed. 571.9926

DAIENE SILVA DA COSTA

MODELAGEM PROBABILÍSTICA DO CRESCIMENTO DE *Listeria monocytogenes* EM FUNÇÃO DO EFEITO DE pH, TEMPERATURA E TEMPO DE ESTOCAGEM

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de agosto de 2016.

Nélio José de Andrade
(Coorientador)

Patrícia Érica Fernandes
(Coorientadora)

Luís César da Silva

Wilmer Edgard Luera Peña
(Orientador)

Dedico

Dedico este trabalho à minha família, meu porto seguro!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que está sempre ao meu lado.

Aos meus pais, Maria Aparecida e Ruimar, à minha irmã, Renata, à minha avó, “Tita” e à minha tia, Lúcia, pelo amor incondicional.

À Universidade Federal de Viçosa, pelas oportunidades concedidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Wilmer Edgard, pelos ensinamentos e orientação.

Ao professor Nélio, pelos ensinamentos e oportunidades proporcionadas durante minha vida acadêmica.

À professora Patrícia Fernandes, pela amizade, parceria, ensinamentos e oportunidades oferecidas ao longo desses anos de Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos.

À todos do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, pela amizade e convívio diário.

À toda equipe de microbiologia preditiva, em especial, Carmelita, Roberta, Jacqueline e Paulo César, pela amizade, parceria e companhia diária.

Ao João, pela amizade e maravilhosa oportunidade de iniciação à pesquisa no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos.

À todos os meus amigos, que fizeram parte da minha caminhada, tornando meus dias mais leves e agradáveis.

À todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

Enfim, agradeço imensamente à todos que me ajudaram a concluir mais uma etapa importante da minha vida!

BIOGRAFIA

DAIENE SILVA DA COSTA, filha de Ruimar Silva da Costa e Maria Aparecida da Costa, nasceu em Ubá, Minas Gerais, em 29 de agosto de 1991.

Em março de 2010, iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, graduou-se em agosto de 2014, e no mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em 15 de agosto de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo Geral	2
2.2. Objetivos Específicos.....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	2
3.1. A importância do Controle de Patógenos na Indústria de Alimentos ...	2
3.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	3
3.2.1. Características.....	3
3.2.2. Listeriose	4
3.2.3. Propriedades de Virulência.....	4
3.3. Fatores que Afetam o Crescimento Microbiano	6
3.3.1. Efeito dos Ácidos Orgânicos.....	7
3.3.2. Efeito do pH.....	8
3.3.3. Efeito da Temperatura.....	9
3.4. A Importância da Microbiologia Preditiva para a Ciência e Tecnologia de Alimentos	10
3.4.1. A Microbiologia Preditiva	10
3.4.2. Classificação dos Modelos	11
3.4.3. Construção dos Modelos Preditivos	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Preparo do Meio de Cultura e das Soluções Ácidas	20
4.2. Micro-organismo e Preparo do Inóculo	20
4.3. Determinação do pH Mínimo de Crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> em Meio de Cultura, Frente a Diferentes Ácidos Orgânicos	
20	
4.3.1. Delineamento Experimental.....	20
4.3.2. Modelagem e Análise de Dados.....	22
4.4. Avaliação do Crescimento/não Crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio de cultura	22
4.4.1. Delineamento Experimental.....	22

4.4.2. Modelagem e Análise de Dados.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1. Determinação do pH Mínimo de Crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> em Meio de Cultura, Frente a Diferentes Ácidos Orgânicos 26	
5.2. Avaliação do Crescimento/não Crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio de cultura	32
5.2.1. Validação dos Modelos de Probabilidade de Regressão Logística 47	
6. CONCLUSÃO.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMO

COSTA, Daiene Silva da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2016. **Modelagem probabilística do crescimento de *Listeria monocytogenes* em função do efeito de pH, temperatura e tempo de estocagem.** Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña. Coorientadores: Nélio José de Andrade e Patrícia Érica Fernandes.

Listeria monocytogenes é um dos micro-organismos de interesse na indústria de alimentos, por ser capaz de ultrapassar as barreiras impostas durante o processamento e causar a grave doença, denominada listeriose, que possui alta taxa de mortalidade e acomete com maior frequência pessoas imunocomprometidas. Os ácidos orgânicos são empregados no processamento de alimentos para retardar a multiplicação microbiana, dentre os mais utilizados estão os ácidos láctico, acético e, principalmente, o cítrico. Os objetivos desse estudo foram determinar o pH mínimo de crescimento de *L. monocytogenes* em meio de cultura, mediante ao uso dos ácidos láctico, acético e cítrico e modelar os limites de crescimento/não crescimento desse micro-organismo em meio de cultura, por meio de enfoque probabilístico, em função do efeito de pH, temperatura e tempo de estocagem, com posterior validação em meio de cultura e em matriz alimentícia, para determinar a confiabilidade e especificar a versatilidade dos modelos probabilísticos gerados. Para determinar o pH mínimo de crescimento de *L. monocytogenes* em meio de cultura, frente aos diferentes ácidos orgânicos, foi utilizado caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), que teve o pH ajustado para valores de 4,0 a 6,0, em um intervalo de 0,2, com os ácidos na concentração de 1 mol.L⁻¹. O crescimento de *L. monocytogenes*, em diferentes valores de pH, foi monitorado pela medida da Densidade Óptica (D.O) a 600 nm. Os ensaios foram realizados a 35 °C, durante 7 dias. As taxas de crescimento foram ajustadas ao modelo de raiz quadrada, sendo um modelo para cada antimicrobiano estudado. Para a modelagem dos limites de crescimento/não crescimento de *L. monocytogenes*, o pH do caldo BHI, foi ajustado em 4,6, 5,5, 6,5 e 7,0, utilizando o ácido láctico; 5,0, 5,8, 6,6 e 7,0, empregando o ácido acético e 4,4, 5,4, 6,5 e 7,0, usando o ácido cítrico. Os tubos de ensaio contendo o meio de cultura e o micro-organismo

estudado foram incubados a 5 °C, 10 °C , 15 °C , 25 °C e 35 °C, durante 21 dias. O desenvolvimento bacteriano foi acompanhado pela determinação da D.O a 600 nm. O inóculo inicial em todos os tratamentos foi de aproximadamente $1,0 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹. Observou-se que o menor valor de pH mínimo para o crescimento de *L. monocytogenes* ocorreu ao ser empregado o ácido cítrico e o maior valor, ao ser empregado o ácido acético. A diferença estatística ($p < 0,05$) entre as taxas de crescimento, calculadas pelos modelos de Baranyi e Roberts (empregando o *software* DMFit 2.1), para cada antimicrobiano, sugeriu que o ácido cítrico é o menos efetivo para a inibição do crescimento do micro-organismo pesquisado. O modelo de raiz quadrada descreveu bem as taxas de crescimento em função de diferentes valores de pH ($R^2 > 0,87$). O modelo probabilístico de regressão logística mostrou-se como importante ferramenta para descrição da região de interface de crescimento/não crescimento. Para cada ácido foi gerado um modelo de probabilidade de regressão logística. Houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as predições destes modelos, em que o ácido acético foi indicado como o melhor antimicrobiano. A validação dos modelos probabilísticos demonstrou que estes podem ser utilizados para prever o comportamento de *L. monocytogenes* nas condições estudadas. A utilização da modelagem probabilística é útil para a indústria alimentícia, por fundamentar a escolha da formulação que retarda ao máximo o crescimento microbiano, assegurando maior vida de prateleira aos alimentos e a saúde do consumidor.

ABSTRACT

COSTA, Daiane da Silva, MSc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2016. **Probabilistic modeling of *Listeria monocytogenes* growth due to the effect of pH, temperature and storage time.** Adviser: Wilmer Edgard Luera Peña. Co-advisers: Nelio José de Andrade and Patricia Érica Fernandes.

Listeria monocytogenes is one of the micro-organisms of interest in the food industry, being able to overcome the barriers imposed during processing and cause serious disease called listeriosis, which has a high mortality rate and affects more often immunocompromised persons. The organic acids are used in food processing to retard microbial growth, among the most used are the lactic acid, acetic acid, and especially citric. The objectives of this study were to determine the minimum growth pH of *L. monocytogenes* in culture medium through the use of the acids lactic, acetic and citric and model the limits growth/no growth of this micro-organism in the culture medium by probabilistic approach, due to the effect of pH, temperature and time of storage, subsequent validation in culture medium and food matrix, to determine the reliability and specify the versatility of the generated probabilistic models. To determine the minimum growth pH of *L. monocytogenes* in culture, compared with different organic acids, were used Brain Heart Infusion Broth (BHI) had pH values adjusted to 4.0 to 6.0, in a range of 0.2, with acid at a concentration of 1 mol.L⁻¹. The growth of *L. monocytogenes*, at different pHs was monitored by measuring the optical density (O.D.) at 600 nm. Assays were performed at 35 °C for 7 days. Growth rates were adjusted to the square root model, being a model for each antimicrobial studied. For the modeling of the limits of growth/no growth of *L. monocytogenes*, the pH of the BHI broth was adjusted at 4.6, 5.5, 6.5 and 7.0 using lactic acid; 5.0, 5.8, 6.6 and 7.0, using acetic acid and 4.4, 5.4, 6.5 and 7.0 using citric acid. The test tubes containing the culture medium and the micro-organism studied were incubated at 5 °C, 10 °C, 15 °C, 25 °C and 35 °C for 21 days. The bacterial growth was monitored by determining the O.D. at 600 nm. The initial inoculum for all treatments was approximately 1.0 x 10³ UFC.mL⁻¹. It was observed that the lowest minimum pH for growth of *L.*

monocytogenes was to be used citric acid and the largest value when the acetic acid employed. The statistical difference ($p < 0.05$) growth rates calculated by the models of Baranyi and Roberts (employing DMFit 2.1 software) for each antimicrobial suggested that citric acid is less effective for inhibiting the growth of studied micro-organism. The square root model described and growth rates depending on different pH values ($R^2 > 0.87$). The probabilistic model of logistic regression showed up as an important tool for describing the interface region growth/no growth. For each acid generated a logistic regression model likelihood. There was a statistical difference ($p < 0.05$) between the predictions of these models, in which the acetic acid was indicated as the best antimicrobial. The validation of probabilistic models demonstrated that these can be used to predict the behavior of *Listeria monocytogenes* under the conditions studied. The use of probabilistic modeling is useful for the food industry, to support the choice of the formulation that retards the maximum microbial growth, ensuring longer shelf life to food and consumer health.

1. INTRODUÇÃO

A cada ano milhares de pessoas são acometidas por doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados em todo mundo. Um dos objetivos da indústria de alimentos é fornecer ao consumidor produtos de qualidade e seguros, e para isso, é necessário evitar a contaminação dos mesmos com micro-organismos patogênicos e deterioradores.

Listeria monocytogenes é um dos patógenos que mais preocupa a indústria alimentícia. Essa bactéria é capaz de vencer barreiras impostas pelas indústrias durante o processamento de alimentos como, redução de pH e temperatura. Causa uma doença grave chamada listeriose, que possui alta taxa de mortalidade e acomete com maior frequência mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e pessoas imunocomprometidas. Sua principal via de obtenção se dá pela ingestão de alimentos contaminados. Produtos lácteos, frutas, hortaliças e frutos do mar são os principais alimentos envolvidos com surtos de listeriose no mundo.

Ácidos orgânicos são empregados na indústria de alimentos com o objetivo de retardar a multiplicação microbiana e garantir maior vida de prateleira aos produtos. A efetividade da ação desses ácidos se dá pela entrada dessas substâncias, na forma não dissociada, no interior da célula microbiana. No citoplasma, essas se dissociam e inativam as reações enzimáticas essenciais para a propagação celular. A forma não dissociada de um ácido se encontra em maior quantidade quando o pH do meio (alimento) é menor que seu pKa.

Os ácidos láctico, acético e, principalmente, o cítrico, estão entre os mais utilizados pela indústria alimentícia. São empregados em diversos produtos como, refrescos, refrigerantes, geleias, biscoitos, carnes e conservas de vegetais.

Estudar o comportamento de um patógeno em diferentes condições ambientais permite maior conhecimento a respeito do mesmo, fato que terá grande influência durante todas as etapas da cadeia de produção de um alimento. Diante disso, a microbiologia preditiva é uma ferramenta muito importante para a indústria alimentícia. Os modelos matemáticos empregados podem auxiliar na tomada de decisões, que vão influenciar na

qualidade e segurança microbiológica dos alimentos. Nesse contexto, a modelagem probabilística tem como foco o estudo da interface de crescimento/não crescimento microbiano. Após o processo de ajuste, o modelo pode ser empregado para definir combinações de diversas condições envolvidas no processamento, que influenciam na probabilidade de desenvolvimento dos micro-organismos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar o comportamento de *Listeria monocytogenes* em função do pH do meio, temperatura e tempo de estocagem, utilizando a microbiologia preditiva.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar o pH mínimo de crescimento de *L. monocytogenes* em meio de cultura, frente a diferentes ácidos orgânicos;
- Modelar os limites de crescimento/não crescimento de *L. monocytogenes* em meio de cultura, mediante enfoque probabilístico, em função do efeito de pH, temperatura e tempo de estocagem;
- Validar estatisticamente o modelo probabilístico desenvolvido e determinar sua confiabilidade com dados não utilizados na construção do modelo e em matriz alimentícia.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A importância do Controle de Patógenos na Indústria de Alimentos

As doenças causadas pela ingestão de alimentos inadequados ao consumo são ameaças à saúde pública e ao desenvolvimento econômico. Apesar da falta de dados, acredita-se que sejam elevados os custos gerados pela ingestão de alimentos contaminados, química, física ou biologicamente (KUCHENMÜLLER et al., 2009).

Os animais e o ambiente são reservatórios primários de vários patógenos como, *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. Enterica, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni*, e por meio da contaminação do alimento, devido à ocorrência de falhas ao longo da cadeia de produção, podem infectar os seres humanos. Outros patógenos, como *Shigella* e norovírus, possuem o homem como hospedeiro, e a contaminação dos alimentos com esses agentes se dá por meio do manipulador (BRADEN; TAUXE, 2013).

Segundo dados de 2014 do Centro de Controle de Prevenção de Doenças (CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*), a cada ano 48 milhões de americanos são vítimas de doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados com patógenos, com 28000 hospitalizações e 3000 óbitos. No Brasil, no período de 2000 a 2014, ocorreram 9719 surtos e 192803 pessoas ficaram doentes após a ingestão de alimentos contaminados, conforme relatos do Ministério da Saúde (BRASIL, 2014).

Para garantir a segurança do consumidor e evitar perdas econômicas, as indústrias estão cada dia mais atentas à melhoria da qualidade de seus produtos para se manterem em um mercado cada vez mais competitivo (SALTINI; AKKERMAN, 2012).

3.2. *Listeria monocytogenes*

3.2.1. Características

L. monocytogenes é um micro-organismo temido pela indústria de alimentos. Segundo Gandhi e Chikindas (2007), esse patógeno consegue sobreviver em diversas condições ambientais como, baixas temperaturas, altas concentrações de sais e valores reduzidos de pH, ou seja, é capaz de vencer barreiras impostas no processamento de alimentos, que objetivam garantir um alimento seguro à saúde do consumidor.

A espécie *monocytogenes* é uma das quinze espécies do gênero *Listeria*, que podem ser encontradas em diversos ambientes como, solo e água (SCHODER, 2016).

L. monocytogenes é um micro-organismo gram-positivo, na forma de bastonete, anaeróbio facultativo, não formador de esporo. É móvel por

flagelos peritríqueos, mas só expressa esta motilidade em temperaturas em torno de 25 °C. É catalase positiva, oxidase negativa e possui resultados positivos para Voges-Proskauer e vermelho de metila (HOLT, 1994).

3.2.2. Listeriose

L. monocytogenes causa uma doença muito grave chamada listeriose, com elevada taxa de mortalidade (20,0 % a 30,0 %), quando comparada aos outros patógenos de origem alimentar, e afeta, principalmente, pessoas imunocomprometidas (JEYALETCHUMI et al., 2010). Esta doença é caracterizada por causar sepsia, infecção do sistema nervoso central, meningite, meningoencefalite, endocardite, pericardite, miocardite, pneumonia, hepatite, osteomielite, artrite e gastroenterite. Mulheres grávidas acometidas com listeriose podem abortar ou ter um parto prematuro (DOGANAY, 2003).

Aproximadamente, 1600 pessoas são infectadas por *L. monocytogenes* e 260 morrem a cada ano, vítimas de listeriose nos Estados Unidos. Em 2013 a média de incidência anual de listeriose nesse país foi de 0,26 casos por 100000 indivíduos. Esse micro-organismo é responsável pela terceira principal causa de morte devido ao consumo de alimentos contaminados. Cerca de 90,0 % das pessoas acometidas com esta doença são mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos ou pessoas com sistema imunológico comprometido (CDC, 2014).

Sua principal via de obtenção se dá pelo consumo de alimentos contaminados. Alimentos frescos como leite e derivados, frutos do mar, frutas e vegetais, são os principais envolvidos com surtos compreendendo esta bactéria (FDA, 2008).

O maior surto de listeriose nos Estados Unidos ocorreu em 2011, devido ao consumo de melão contaminado, onde 147 pessoas foram atingidas. Foram registrados 33 óbitos e 1 aborto (CDC, 2014).

3.2.3. Propriedades de Virulência

L. monocytogenes é um patógeno intracelular que consegue sobreviver em células de defesa. Para aderir, colonizar e dar início ao processo infeccioso na mucosa gastrointestinal, essa bactéria precisa

ultrapassar inúmeras barreiras, para que posteriormente, tenha acesso à corrente sanguínea, sendo capaz de atingir diversas células. O processo infeccioso tem início com a adesão da bactéria à superfície da célula hospedeira. A entrada dessa bactéria pode ser por fagocitose, ou por interação de moléculas presentes na superfície bacteriana e na célula hospedeira, caso a célula não seja fagocítica. As principais proteínas de superfície presentes em *L. monocytogenes*, responsáveis por intermediar a interação com a célula hospedeira, são as internalinas A e B (InIA e InIB), codificadas pelos genes *inIA* e *inIB* (JAY, 2009).

No interior do fagossomo o micro-organismo libera fosfolipases e listeriolisina O (LLO), seu principal fator de virulência. Durante a infecção a LLO provoca o rompimento das membranas, em especial das formadas entre vacúolos fagocitários e lisossomas, impedindo a formação dos fagolisossomas, que destruiriam a célula microbiana por meio das hidrolases ácidas. Após o rompimento das membranas ocorre a liberação das hidrolases, que destroem os macrófagos (GEDDE et al., 2000).

Para que ocorra a locomoção no citoplasma e conseqüentemente, a invasão das células adjacentes, o micro-organismo induz, através do gene *actA*, a formação de uma cauda polar de filamentos de actina, presente na célula hospedeira. Quando o patógeno migra para a membrana da célula em que se encontra, é originada uma projeção. Após a inserção da bactéria na estrutura da membrana ocorre a fagocitose desta projeção pela célula adjacente, fazendo com que a bactéria fique envolvida por duas membranas, que posteriormente são desfeitas através da LLO e das fosfolipases, iniciando um novo ciclo, com o surgimento da cauda de actina (TILNEY; PORTNOY, 1989; VÁZQUEZ-BOLANDA et al., 2001; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). O ciclo infeccioso está representado pela Figura 1.

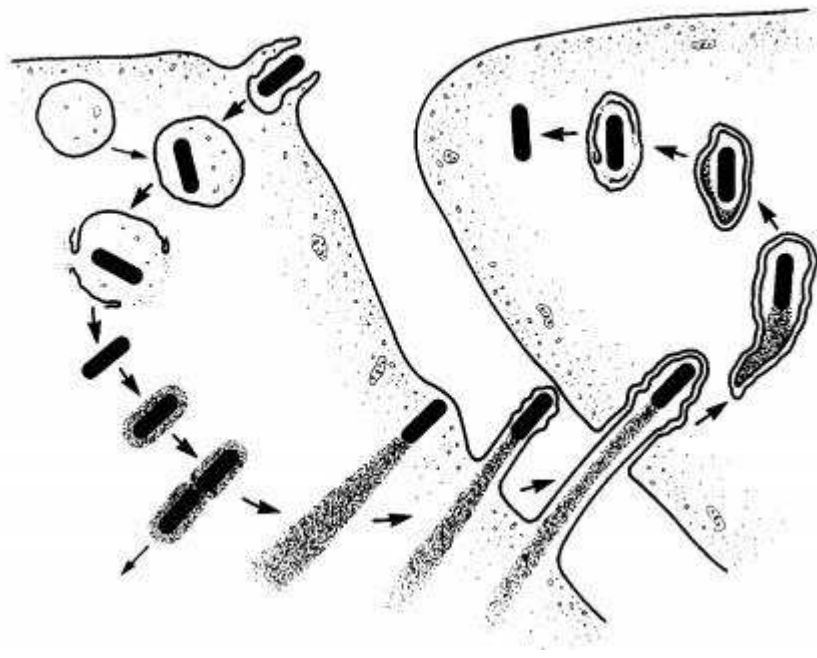


Figura 1 – Representação do ciclo infeccioso de *Listeria monocytogenes*, segundo Tilney; Portnoy (1989).

3.2.4. Controle do Micro-organismo

Para fazer o controle de listeriose é necessário conscientizar os manipuladores de alimentos a respeito das boas práticas de fabricação, a fim de evitar a contaminação dos produtos com o micro-organismo causador dessa doença. Outro fator importante, que deve ser utilizado, juntamente com as boas práticas de fabricação, é a utilização das tecnologias de barreiras, para que o desenvolvimento microbiano seja inibido. É preciso também informar aos consumidores sobre essa grave doença e do perigo de se consumir alimentos crus e mal higienizados (BARANCELLI et al., 2011).

3.3. Fatores que Afetam o Crescimento Microbiano

A capacidade de multiplicação dos micro-organismos depende de uma série de fatores, que podem ser intrínsecos, quando relacionados com características próprias do alimento como, por exemplo, pH, e extrínsecos, quando relacionados com o ambiente onde o alimento é armazenado como, por exemplo, temperatura. A compreensão desses fatores auxilia na conservação dos alimentos (JAY, 2009).

3.3.1. Efeito dos Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos são utilizados na indústria de alimentos como conservantes, ou seja, são usados com o objetivo de inibir a multiplicação microbiana. A efetividade de um ácido orgânico é pronunciada quando o pH do meio (alimento) é menor que o pKa do ácido, condição que favorece a forma não dissociada dessa molécula. Quando a molécula está na forma não dissociada, consegue atravessar a membrana da célula e dissociar em seu interior, fato que inibe reações metabólicas essenciais para o desenvolvimento do micro-organismo (FORSYTHE, 2003; BEILEN et al., 2014).

Quando um micro-organismo é submetido a uma barreira, ou seja, a um estresse, o metabolismo celular cria respostas a esse acontecimento. Um dos mecanismos utilizados para que ocorra o aumento do pH citoplasmático (resposta ao estresse ácido) é o bombeamento de prótons através da enzima H^+ -ATPase (CARMELO; SANTOS; SÁ-CORREIA, 1997). O gasto energético deste mecanismo é muito alto (gasto de ATP) e para conservar os níveis de ATP, a célula microbiana impede a entrada de ácido, modificando o perfil de ácidos graxos presentes na membrana plasmática. Ácidos graxos com baixa insaturação conferem menor flexibilidade à membrana (GOLDEN; BEUCHAT; LARY HITCHCOCK, 1994).

Os ácidos láctico, acético e cítrico são amplamente utilizados na indústria de alimentos. Esses antimicrobianos são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS), fáceis de manipular e possuem baixo custo (MANI-LÓPEZ; GARCÍA; LÓPEZ-MALO, 2012). Dentre os ácidos utilizados na indústria alimentícia, o ácido cítrico é o mais empregado (60,0 % do total) (ANTUNES, 2007).

O ácido láctico, cujo pKa é igual a 3,86, confere ao alimento sabor suave e agradável e é muito utilizado em refrescos, refrigerantes, produtos cárneos e conservas. Muitas vezes sua presença nos alimentos se deve à multiplicação das bactérias lácticas. A dosagem geralmente utilizada está entre 0,05 % a 2,0 % (CHANG, 2009; JAY, 2009; ADITIVOS & INGREDIENTES, 2015b).

O ácido acético, possui pKa igual a 4,76, é uma substância solúvel em água e possui odor acentuado, sendo utilizado como conservante, e, ou aromatizante. É o componente ácido do vinagre (4,0 % a 6,0 %), o que caracteriza o cheiro e o gosto deste produto. É muito empregado na forma de vinagre em conservas de vegetais, *ketchups*, maioneses, carnes e peixes. A dosagem recomendada é de 0,1 % a 5,0 % (FERREIRA; MORAIS; NICHELE; PINO, 2007; CHANG, 2009; FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010; ADITIVOS & INGREDIENTES, 2015a).

O ácido cítrico, possui três valores de pKa, devido a presença de três grupos carboxílicos em sua molécula, cujos valores são 3,13, 4,76 e 6,40, é encontrado em uma variedade de frutas e vegetais. Em razão de ser metabolizado por vários micro-organismos, não é tão eficiente quanto os demais conservantes ácidos. É muito utilizado em bebidas, balas, geleias artificiais, biscoitos, pós para refrescos artificiais, sorvetes e em produtos enlatados, como conservas de vegetais e pescados. Nestes últimos, sua utilização tem como objetivo, diminuir o pH para que a temperatura empregada no tratamento térmico possa ser reduzida. Além de conferir sabor ácido agradável, é muito solúvel em água, apresenta capacidade de complexar metais catalisadores de reações de oxidação e possui baixa toxicidade. A dosagem comumente utilizada é 0,3 % a 4,0 % (EVANGELISTA, 2005; ARAÚJO, 2015).

3.3.2. Efeito do pH

A maioria dos micro-organismos possui maior taxa de crescimento em valores de pH próximos da neutralidade. Os fungos conseguem se desenvolver em valores reduzidos, o que geralmente não ocorre com as bactérias, principalmente, as patogênicas, que são mais exigentes. *L. monocytogenes* é um patógeno que se destaca por conseguir se multiplicar em inúmeras condições ambientais. Apesar de ter sua taxa ótima de multiplicação em valores de pH na faixa de 6,0 a 8,0, consegue se desenvolver em valores abaixo de 4,5 (JAY, 2009).

A redução do pH é uma das barreiras utilizadas para inibir a multiplicação microbiana. Quando o pH do meio, em que o micro-organismo se encontra, é ajustado com ácido fraco, o ácido, por ser lipofílico, consegue

permeiar (em sua forma não dissociada) a membrana plasmática. No interior da célula microbiana, ocorre a dissociação do ácido, o que inibe o funcionamento normal da mesma, devido a diminuição do pH interno. Quando o ajuste é realizado com ácido forte, ocorre a inativação de enzimas da superfície celular e diminuição do pH citoplasmático, devido o aumento do gradiente de permeabilidade de prótons (BEALES, 2004; STRATFORD et al., 2013). Em resposta a este estresse, uma das alternativas utilizadas pelo micro-organismo é o aumento da proporção de ácidos graxos saturados, constituintes da membrana plasmática, que diminui sua fluidez, o que impede o abaixamento do pH intracelular e a inativação da célula (LEPAGE et al., 1987).

3.3.3. Efeito da Temperatura

Um dos fatores ambientais mais importantes para o desenvolvimento microbiano é a temperatura. A maioria dos micro-organismos tem taxa de crescimento aumentada na faixa de 30 °C a 40 °C, ótima para a maioria dos patógenos. Quanto mais baixa for a temperatura de armazenamento em que um alimento contaminado se encontra, menor é a taxa de multiplicação do micro-organismo contaminante (SOERENSEN; MARULLI, 1999).

Os micro-organismos são classificados segundo a faixa de temperatura ótima de multiplicação. São considerados mesófilos aqueles que têm maior taxa de multiplicação em temperaturas em torno de 30 °C a 45 °C; termófilos, os que possuem temperatura ótima na faixa de 55 °C a 75 °C; psicrófilos são micro-organismos que possuem taxa ótima de multiplicação em torno de 12 °C a 15 °C, e psicrotróficos, os que possuem um ótimo em temperaturas de 25 °C a 30 °C (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009). Estes últimos, são grupos de grande importância para a indústria de alimentos, pois apesar de possuir taxa ótima de multiplicação em um intervalo de temperatura parecido com o dos micro-organismos mesófilos, conseguem se multiplicar em temperaturas de refrigeração. Dentre os gêneros psicrotróficos encontram-se *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Hafnia* e *Serratia*. Bactérias patogênicas, como *L. monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*, também fazem parte do grupo de micro-organismos psicrotróficos (ANDERSON; PASCUAL, 2000).

A utilização do frio e do calor na indústria de alimentos tem o objetivo de inibir ou destruir os micro-organismos, através da inativação enzimática, desnaturação protéica, alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática e oxidação de substâncias essenciais para o funcionamento celular (ANDREDE, 2006). Os micro-organismos são capazes de vencer as barreiras do choque frio e do choque térmico através de mudanças no perfil lipídico da membrana plasmática. Para resistir ao choque frio, os micro-organismos aumentam a proporção de ácidos graxos insaturados e diminuem o comprimento da cadeia carbônica dos mesmos, com o objetivo de aumentar a fluidez da membrana; o oposto ocorre quando as células são submetidas ao choque térmico, a porção de ácidos graxos saturados aumenta, para diminuir a fluidez da membrana. Outra alternativa, para superar essas barreiras é a síntese de proteínas do choque frio e do choque térmico, que vão preservar ou reparar os danos celulares, respectivamente (KATES; BAXTER, 1962; JAKOBSEN; PELHAM, 1991; RUSSELL et al., 1995; RUSSELL, 2002).

3.4. A Importância da Microbiologia Preditiva para a Ciência e Tecnologia de Alimentos

3.4.1. A Microbiologia Preditiva

A obtenção de alimentos seguros é objetivo de toda indústria alimentícia, fato que previne a ocorrência de doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados com patógenos (SAVOV; KOUZMANOV, 2014).

Segundo dados do CDC, em 2013 foram notificados nos Estados Unidos, 818 surtos, 1062 internações e 16 mortes envolvendo alimentos contaminados com patógenos. Foram catalogados também, 14 *recalls* de alimentos inadequados ao consumo. No Brasil, nesse mesmo ano, foram registrados 800 surtos e 16720 pessoas ficaram doentes. Até meados de 2014, foram listados 209 surtos com 2950 pessoas doentes (BRASIL, 2014).

Neste sentido, a microbiologia preditiva, termo utilizado para descrever estudos de modelos matemáticos desenvolvidos para a investigação do comportamento microbiano, é essencial para a garantia da qualidade e segurança microbiológica dos alimentos (MCMEEKIN; ROSS;

OLLEY, 1992). É uma ferramenta que permite a predição de respostas de crescimento, sobrevivência e morte de micro-organismos, frente a fatores como, temperatura, condições de armazenamento, atividade de água e pH, admitindo avaliar riscos, vida de prateleira, desenvolver novos produtos e processos e tomar decisões importantes para o bom funcionamento industrial (ROSS; MCMEEKIN, 1994).

A primeira descrição da utilização da microbiologia preditiva foi provavelmente na década de 20, quando Esty e Meyer, em 1922, delinearam a inativação térmica, através de um simples modelo matemático (log-linear), de *Clostridium botulinum* tipo A (BARANYI; ROBERTS, 2004). Contudo, somente na década de 80 que esta ferramenta passou a ser utilizada com maior assiduidade, com o objetivo de evitar os frequentes surtos causados pelo consumo de alimentos contaminados, nos Estados Unidos, Reino Unido, Austrália e Nova Zelândia. A facilidade de acesso à tecnologia nos dias atuais e as limitações dos métodos microbiológicos tradicionais, como por exemplo, o custo elevado e a demora dos resultados das análises, também contribuíram para o aumento do interesse pela microbiologia preditiva (BUCHANAN, 1993; MCMEEKIN et al., 1993).

3.4.2. Classificação dos Modelos

Os modelos matemáticos empregados na microbiologia preditiva são classificados em mecanísticos e empíricos, estes últimos podem ser classificados em cinéticos ou probabilísticos. Modelos mecanísticos são aqueles que descrevem a atuação microbiana com base teórica, permitindo a interpretação da mesma em termos de fatos conhecidos. Modelos empíricos apresentam um grupo de dados em uma apropriada relação matemática (FAKRUDDIN; MAZUMDAR; MANNAN, 2012), são mais utilizados, porém, limitados por não predizerem respostas além do intervalo de dados empregados para a construção dos modelos, fato que mostra certa carência de uma base mecanística (KRIST; ROSS; MCMEEKIN, 1998). Os modelos cinéticos fornecem informações a respeito do comportamento microbiano, já os probabilísticos, predizem a ocorrência de um dado evento (NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000).

Os modelos matemáticos ainda podem ser classificados em três níveis, primários, secundários e terciários. Os modelos primários apresentam as respostas microbianas em função do tempo (tempo de geração, duração da fase lag, taxa de crescimento e densidade populacional máxima). Estas respostas podem ser determinadas de maneira direta como, contagem em placa e formação de toxina e indiretamente, por densidade óptica (D.O). Os modelos secundários descrevem a alteração das respostas obtidas com os modelos primários, em função da variação de uma condição ambiental. Os modelos terciários são compostos por programas computacionais que mesclam os modelos primários e secundários. Podem calcular para seus usuários, respostas microbianas em diferentes condições, o que permite a utilização por pessoas desprovidas de conhecimento matemático (WHITING; BUCHANAN, 1993; WHITING; BUCHANAN, 1994).

3.4.2.1. Modelo Primário Importante na Microbiologia Preditiva

3.4.2.1.1. Modelo de Baranyi e Roberts

O modelo de Baranyi e Roberts, largamente utilizado na microbiologia preditiva, se destaca por incluir fase exponencial linear ($\mu_{m\acute{a}x}$) e fase lag determinada por uma função de ajuste ($\alpha(t)$) (BARANYI; ROBERTS, 1994). É classificado como empírico, cinético e primário. Sua fórmula está representada pela Equação 1.

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

Em que:

$y(t)$ = população microbiana no tempo t (log(UFC.mL⁻¹));

y_0 = população microbiana inicial no tempo t_0 (log(UFC.mL⁻¹));

$\mu_{m\acute{a}x}$ = taxa de crescimento máxima (log(UFC.mL⁻¹.h⁻¹));

m = parâmetro relacionado à curvatura depois da fase exponencial;

$y_{m\acute{a}x}$ = população microbiana máxima (log(UFC.mL⁻¹)).

A função $A(t)$, representada pela Equação 2, é a integral da função de ajuste (Equação 3), que por sua vez, é uma associação do estado fisiológico do inóculo (q_0) e da taxa de adaptação ao novo ambiente (v). Essa associação torna o modelo mais completo. Se o micro-organismo não está preparado para seu desenvolvimento (q_0 baixo), e, ou se a taxa de adaptação é lenta (v baixo), a fase lag será ampliada em um tempo t .

$$A(t) = t + \frac{1}{v} \ln \left(\frac{e^{-vt} + q_0}{1 + q_0} \right) \quad (2)$$

$$\alpha(t) = \frac{q_0}{q_0 + e^{-vt}} \quad (3)$$

3.4.2.2. Modelos Secundários Importantes na Microbiologia Preditiva

3.4.2.2.1. Modelo de Raiz Quadrada

O modelo de raiz quadrada, muito utilizado na microbiologia preditiva, foi desenvolvido para descrever o efeito da temperatura na taxa de crescimento microbiano (RATKOWSKY et al., 1982). É classificado como empírico, cinético e secundário. Utilizando pH como variável de entrada no modelo de raiz quadrada proposto por Huang (2011) tem-se a Equação 4.

$$\sqrt{\mu_{m\acute{a}x}} = b (pH - pH_{m\acute{i}n})^{0,75} \quad (4)$$

Em que:

$\mu_{m\acute{a}x}$ = taxa de crescimento máxima ($\log(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$);

b = parâmetro a ser estimado;

pH = pH subótimo (de interesse);

$pH_{m\acute{i}n}$ = pH mínimo em que a velocidade de crescimento extrapolada é zero.

3.4.2.2.2. Modelo de Probabilidade de Regressão Logística

O modelo de probabilidade de regressão logística, um dos modelos mais utilizados na microbiologia preditiva, é classificado como empírico, probabilístico e secundário. Segundo Gortmaker; Hosmer; Lemeshow (1994), este modelo descreve a probabilidade de ocorrência de um dado evento Y , dependente de um vetor x . Sua fórmula está representada pela Equação 5.

$$P(x) = \frac{e^{\beta_0 + \sum \beta_i x_i}}{1 + e^{\beta_0 + \sum \beta_i x_i}} \quad (5)$$

Em que:

$P(x)$ = probabilidade de ocorrer ou não determinado evento, como por exemplo, a probabilidade de crescimento ou não crescimento de um patógeno;

β_0 e β_i = coeficientes do modelo;

x_i = variáveis independentes.

A transformação de $P(x)$, essencial para sua linearização, propriedade desejável presente em um modelo de regressão linear, é dada pela transformação logit, representada pela Equação 6.

$$\text{Logit}(P) = g(x) = \ln \left[\frac{P(x)}{1 - P(x)} \right] = \beta_0 + \sum \beta_i x_i \quad (6)$$

Em que:

$g(x)$ = transformação logit;

β_0 e β_i = coeficientes do modelo;

x_i = variáveis independentes.

3.4.2.3. Modelos Terciários Importantes na Microbiologia Preditiva

3.4.2.3.1. DMFit

O DMFit é um suplemento do excel, utilizado para investigação dos parâmetros de crescimento microbiano como, taxa de crescimento e tempo de fase lag. “*A dynamic approach to predicting bacterial growth in food*”, publicação de Baranyi e Roberts em 1994, foi utilizada como referência para a criação do mesmo, que está disponível no *Combined Database for Predictive Microbiology* (COMBASE) (COMBASE, 2016).

3.4.2.3.2. Pathogen Modeling Program (PMP)

O PMP é um *software* desenvolvido pelo Serviço de Pesquisa Agrícola do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA-ARS), com o objetivo de realizar predições de crescimento e inativação de diversos micro-organismos, como *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica*, em inúmeras condições ambientais (PMP, 2015).

3.4.3. Construção dos Modelos Preditivos

Os modelos preditivos utilizados na ciência e tecnologia de alimentos, em sua grande maioria, são classificados como empíricos, este fato não permite a utilização destes modelos para predições fora do intervalo dos fatores ambientais que os originou. Para a criação de modelos seguros é preciso que sejam estabelecidas hipóteses quanto à aleatoriedade, normalidade, parcimônia e especificações estocásticas (MCMEEKIN, et al., 1993).

3.4.3.1. Investigação dos Fatores para o Controle

Para a construção de um modelo preditivo é preciso definir algumas questões importantes, como, qual será a variável dependente, quais serão as variáveis independentes, qual será o inóculo e quais os meios utilizados

no experimento que vai gerar o modelo (DODDS, 1993; WHITING; BUCHANAN, 1997).

3.4.3.1.1. Variável Dependente

Variável dependente é a resposta obtida através da manipulação de variáveis independentes. Duração da fase lag, tempo de geração e tempo necessário para atingir certa densidade populacional são as principais respostas procuradas em um modelo (NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000).

3.4.3.1.2. Variáveis Independentes

Variáveis independentes são fatores, que quando manipulados, geram uma resposta (variável dependente). O comportamento dos micro-organismos é definido essencialmente por quatro fatores: pH, atividade de água, temperatura e atmosfera. É importante que no intervalo das variáveis que irão compor o modelo, estejam os valores de interesse, caso contrário, as previsões feitas pelo modelo gerado poderão ser perigosas (WHITING, 1997).

3.4.3.1.3. Inóculo

O tamanho do inóculo exerce influência no tempo de duração da fase lag do micro-organismo, devido à variabilidade das células microbianas. Quanto menor for o tamanho do inóculo, maior será o tempo de duração da fase lag e a probabilidade de crescimento microbiano (BARANYI, 1998; MÉTRIS et al., 2003; KOUTSOUMANIS; SOFOS, 2005).

É preciso escolher um inóculo que permita a aferição das respostas microbianas (BESSE et al., 2006).

3.4.3.1.4. Meios Utilizados no Experimento

Meios de cultura, em sua maioria líquidos, são os meios experimentais mais utilizados para a geração de modelos preditivos. A desvantagem da utilização destes meios é o comprometimento da reprodução exata das condições da matriz alimentícia, em que se deseja

aplicar a modelagem preditiva. Para minimizar este problema, a validação do modelo, gerado em meio de cultura, deve ser realizada no alimento desejado para a aplicação da ferramenta em questão. Quando um alimento é empregado como meio experimental, o modelo fica limitado e só pode ser aplicado para predições envolvendo esta matriz alimentícia (MCMEEKIN et al., 1993).

3.4.3.2. Design Experimental

As variáveis independentes, seus intervalos e suas combinações devem ser definidos com cautela para que o modelo gerado possa atender as expectativas de uso. Quando se deseja utilizar um modelo, gerado em meio de cultura, para um determinado alimento, o ajuste do meio experimental utilizado deve ser de acordo com as características deste alimento (pH, aw, etc.). Este cuidado deve ser tomado porque os modelos preditivos utilizados para alimentos são de caráter empírico (BLACKBURN, 2000).

Outro fator que deve ser determinado com prudência é o tempo de aferição das amostras. É preciso escolher intervalos de tempo que proporcionam um bom acompanhamento do comportamento microbiano (ROSS, T., MCMEEKIN, 1991).

3.4.3.3. Coleta de Dados

A coleta de dados para a geração de um modelo preditivo pode ser realizada por métodos diretos e indiretos.

Os dados coletados, ou seja, as medidas da mudança da densidade celular com o passar do tempo, irão fornecer uma curva de crescimento, composta por quatro fases, fase lag, log, estacionária e de morte. Na fase, lag a célula microbiana se adapta ao novo meio; na fase log, o metabolismo celular está totalmente envolvido com o crescimento da célula, a população de células aumenta em ordem logarítmica; na fase estacionária, a velocidade de morte celular é igual à velocidade de crescimento. Nessa fase, as células começam a morrer, devido a diminuição de nutrientes e liberação de componentes tóxicos pelas células, no meio de crescimento; na fase de morte, o meio é incapaz de proporcionar o desenvolvimento celular, devido a

falta de nutrientes e a elevada quantidade de substâncias tóxicas. A morte microbiana também é em ordem logarítmica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O conhecimento das fases de uma curva microbiana ajuda no momento de interpretar os resultados dos parâmetros cinéticos, preditos pelos modelos preditivos. Por exemplo, um tempo elevado da fase lag, indica que em determinada condição, o crescimento microbiano será retardado. Esse fato é importante para a indústria de alimentos, que tem como objetivo retardar ao máximo o desenvolvimento dos micro-organismos, a fim de aumentar a vida de prateleira de seus produtos (ROSS; MCMEEKIN, 1994).

3.4.3.4. Modelagem e Validação

O modelo é originado por meio da análise dos dados gerados em experimento. O conhecimento de áreas como estatística e álgebra é importante no desenvolvimento de modelos preditivos, uma vez que se trabalha com estimativas de respostas e com ajustes de parâmetros (MCMEEKIN et al., 1993; BLACKBURN, 2000).

O procedimento de validação do modelo é essencial para a definição do nível de confiabilidade e para o estabelecimento das restrições quanto ao emprego do mesmo. Por meio da validação é possível avaliar quantitativamente o quanto o modelo explica os dados experimentais. A validação do modelo preditivo é determinada com base em índices estatísticos como, fator BIAS, fator exatidão e coeficiente de determinação (R^2) (ROSS, 1996; WHITING; BUCHANAN, 1997).

○ Fator BIAS

Segundo Ross (1996), o fator BIAS fornece os desvios de um modelo preditivo. Valores menores que 1 indicam que o modelo erra numa região segura, ou seja, as predições das taxas de crescimento são maiores que os valores observados, o oposto ocorre para valores maiores que 1. Para sua determinação é utilizado a Equação 7.

$$fB = 10^{(\sum \log(\frac{\mu_{observado}}{\mu_{predito}})/n)} \quad (7)$$

Em que:

$\mu_{observado}$ = taxa de crescimento específica observada;

$\mu_{predito}$ = taxa de crescimento específica predita

n = número de observações.

○ **Fator Exatidão**

O fator exatidão indica o quão próximo é o valor predito do valor observado. Seu valor é sempre maior que 1, quanto maior, menos exato é o modelo preditivo (ROSS, 1996). Para sua determinação é empregada a Equação 8.

$$fe = 10^{(\sum |\log \mu_{predito}/\mu_{observado}|/n)} \quad (8)$$

Em

que:

$\mu_{predito}$ = taxa de crescimento específica predita;

$\mu_{observado}$ = taxa de crescimento específica observada;

n = número de observações.

○ **R²**

O R² é comumente utilizado como uma medida geral de predição dos modelos matemáticos. Seu valor é dado entre 0 e 1 e indica a porção de variação em torno da média. Quanto mais próximo de 1, melhor é a predição do modelo (HAIR et al., 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparo do Meio de Cultura e das Soluções Ácidas

O meio de cultura utilizado foi o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Himedia®), preparado conforme instruções do fabricante. As soluções de ácido láctico (Alphatec®), ácido acético (F.maia®) e ácido cítrico (Vetec®) foram preparadas na concentração de 1 mol.L^{-1} , filtradas em membranas de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$, e esterilizadas em autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. Depois de filtradas, as soluções foram armazenadas em temperatura de refrigeração.

4.2. Micro-organismo e Preparo do Inóculo

O experimento foi realizado com *Listeria monocytogenes* sorovar 1/2b (UFV_2), isolada de melão por Souza (2014).

Com auxílio de uma alça de platina, uma alíquota da cultura do micro-organismo, congelada a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ em tubo *ependorff* contendo caldo BHI e glicerol na proporção 80:20, foi ativada em caldo BHI por duas vezes consecutivas e incubada a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ por 18 h. Para a padronização do inóculo foi realizada leitura da D.O em espectrofotômetro (Kazuaki IL-227), no comprimento de onda de 625 nm, onde a absorbância foi ajustada para 0,100, equivalente a, aproximadamente, $1,0 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$, de acordo com padrão McFarland 0,5. Após o ajuste, foram feitas diluições em caldo BHI para a obtenção de, aproximadamente, $1,0 \times 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$.

4.3. Determinação do pH Mínimo de Crescimento de *Listeria monocytogenes* em Meio de Cultura, Frente a Diferentes Ácidos Orgânicos

4.3.1. Delineamento Experimental

Nesse experimento foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial completo, cujos fatores foram três níveis de ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido acético e ácido cítrico) e 11 níveis de pH (4,0, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0). O experimento foi realizado em duas repetições com duplicatas.

Após o ajuste do pH com as soluções dos ácidos citados acima, o meio de cultura foi transferido para tubos de ensaio, devidamente identificados, que posteriormente foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. Em seguida, foram inoculadas aproximadamente $1,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ de *L. monocytogenes* aos tubos de ensaio, contendo 20 mL do meio de cultura, para a obtenção da concentração inicial em torno de $1,0 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹, que foram incubados a 35 °C, durante 7 dias. De acordo com a curva de crescimento fornecida *software* PMP 7.0, para as condições estudadas, periodicamente foram realizadas medidas de D.O a 600 nm para o acompanhamento da multiplicação microbiana. A primeira medida foi feita após a inoculação do micro-organismo.

A Tabela 1 apresenta as concentrações totais e as concentrações da forma não dissociada dos ácidos estudados, em seus respectivos valores de pH. Para o cálculo das concentrações da forma não dissociada foi utilizada a Equação 9.

$$\text{Ácido não dissociado (g . L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Concentração Total do ácido (g . L}^{-1}\text{)}}{1 + 10^{(pH-pK_a)}} \quad (9)$$

Tabela 1 – Concentrações dos ácidos estudados (g.L⁻¹) para a determinação do pH mínimo de crescimento de *Listeria monocytogenes*.

pH	4,0	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2	5,4	5,6	5,8	6,0
[AL]	7,200	6,750	6,300	5,850	5,400	4,950	4,500	4,050	3,150	2,700	2,250
[AA]	5,705	5,405	5,104	4,804	4,504	4,203	3,903	3,603	3,303	3,002	2,702
[AC]	12,553	11,588	10,622	9,656	8,691	7,725	6,760	5,794	4,828	3,863	2,897
[AL ND]	2,984	2,084	1,385	0,883	0,545	0,327	0,192	0,111	0,055	0,029	0,015
[AA ND]	4,843	4,216	3,528	2,813	2,122	1,513	1,022	0,659	0,409	0,246	0,144
[AC ND]	1,492	0,909	0,541	0,316	0,182	0,103	0,057	0,031	0,016	0,008	0,004

[AL] = concentração total de ácido láctico; [AA] = concentração total de ácido acético; [AC] = concentração total de ácido cítrico; [AL ND] = concentração de ácido láctico na forma não dissociada; [AA ND] = concentração de ácido acético na forma não dissociada; [AC ND] = concentração de ácido cítrico na forma não dissociada.

4.3.2. Modelagem e Análise de Dados

Os valores de D.O para cada condição de pH e tempo de estocagem, em que houve crescimento de *L. monocytogenes*, foram ajustados ao modelo de Baranyi e Roberts (Equação 1), por meio do *software* DMFit 2.1. Este modelo foi avaliado pelo R^2 e foi essencial para a obtenção das taxas de crescimento máxima do micro-organismo estudado, em seus respectivos valores de pH, que foram utilizadas para gerar o modelo de raiz quadrada (Equação 4), por meio do *software* Statística 7, utilizando o comando de regressão não linear.

O modelo de raiz quadrada foi avaliado pela significância dos coeficientes, R^2 , fator BIAS e fator exatidão. Esse modelo foi importante para a predição do valor do pH mínimo necessário para o crescimento de *L. monocytogenes*, comparado com o valor observado experimentalmente. Para cada ácido foi gerado um modelo primário e um secundário.

Para a comparação das taxas de crescimento de *L. monocytogenes*, obtidas para cada ácido, foi empregado o *software* Statística 7 para a realização da Análise de Variância (ANOVA) e teste de médias (Tukey), a 0,05 de probabilidade.

4.4. Avaliação do Crescimento/não Crescimento de *Listeria monocytogenes* em meio de cultura

4.4.1. Delineamento Experimental

Nesse experimento foi utilizado o delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial completo, cujos fatores foram três níveis de ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido acético e ácido cítrico), quatro níveis de pH (pH mínimo, que foi o encontrado com a metodologia referida no item 4.3.1, dois valores intermediários e pH 7,0) e cinco níveis de temperatura (5 °C, 10 °C, 15 °C, 25 °C e 35 °C). O experimento foi realizado em duas repetições com triplicatas.

Após o ajuste do pH com as soluções dos ácidos citados acima, o meio de cultura foi transferido para tubos de ensaio, devidamente identificados, que posteriormente foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. Em seguida, foram inoculadas aproximadamente $1,0 \times 10^5$

UFC.mL⁻¹ de *L. monocytogenes* aos tubos de ensaio, contendo 20 mL do meio de cultura, para a obtenção da concentração inicial em torno de 1,0 x 10³ UFC.mL⁻¹, que foram incubados nas temperaturas estudadas por 21 dias. De acordo com a curva de crescimento fornecida pelo *software* PMP 7.0, para as condições estudadas, periodicamente foram realizadas medidas de D.O a 600 nm para o acompanhamento da multiplicação microbiana. A primeira medida foi feita após a inoculação do micro-organismo.

A Tabela 2 exibe as concentrações totais e as concentrações da forma não dissociada dos ácidos estudados, em seus respectivos valores de pH. Para o cálculo das concentrações da forma não dissociada foi utilizada a Equação 9.

Tabela 2 – Concentrações dos ácidos estudados (g.L⁻¹) para a avaliação do crescimento/ não crescimento de *Listeria monocytogenes*.

pH	[AL]	[AL ND]
4,6	5,8500	0,8832
5,5	3,6000	0,0788
6,5	1,8000	0,0040
7,0	1,3500	0,0010
pH	[AA]	[AA ND]
5,0	4,2035	1,5130
5,8	3,0025	0,2457
6,6	2,4020	0,0335
7,0	2,1018	0,0118
pH	[AC]	[AC ND]
4,4	10,6222	0,5414
5,4	5,7939	0,0309
6,5	1,9313	0,0008
7,0	0,9657	0,0001

[AL] = concentração total de ácido láctico; [AA] = concentração total de ácido acético; [AC] = concentração total de ácido cítrico; [AL ND] = concentração de ácido láctico na forma não dissociada; [AA ND] = concentração de ácido

acético na forma não dissociada; [AC ND] = concentração de ácido cítrico na forma não dissociada.

4.4.2. Modelagem e Análise de Dados

A matriz gerada pelas combinações dos fatores estudados (pH, temperatura e tempo de estocagem) e respostas de crescimento, obtidas com as medidas de D.O (codificadas em 0 e 1), foi ajustada ao modelo secundário de probabilidade de regressão logística (Equação 5), por meio do *software* SPSS 8.0, utilizando o comando de regressão logística. Esse modelo foi avaliado pela significância dos coeficientes, R^2 e porcentagem de acertos.

Para cada ácido orgânico foi gerado um modelo, em que pH, temperatura e tempo de estocagem representam variáveis independentes, e a probabilidade de crescimento (1) e não crescimento (0) de *L. monocytogenes*, variável dependente.

Foi considerado crescimento quando houve um aumento de 0,025 no valor da D.O, o que equivale um aumento de 1 ciclo log do micro-organismo estudado.

De acordo com a Equação 6, o modelo logit utilizado está representado pela Equação 10.

$$g(x) = \beta_0 + \beta_1pH + \beta_2T + \beta_3t + \beta_4pHT + \beta_5pHt + \beta_6Tt + \beta_7pH^2 + \beta_8t^2 \quad (10)$$

Em que:

$\beta_0 - \beta_8$ = coeficientes do modelo;

T = temperatura (°C);

t = tempo de estocagem (h).

Após o ajuste dos dados ao modelo de regressão logística, foram realizadas predições de tempo e temperatura de estocagem, com probabilidades de 0,5, 0,1 e 0,05, através da substituição do valor de $P(x)$ no modelo da Equação 5, sendo calculados, mantendo as demais variáveis independentes fixas. As probabilidades de crescimento da bactéria para as

condições estudadas também foram calculadas, utilizando a mesma equação.

Para a comparação das probabilidades, tempo e temperatura de estocagem, obtidos para cada ácido, foi utilizado o *software* Statistica 7 para a realização da Análise de Variância (ANOVA) e teste de médias (Tukey), a 0,05 de probabilidade.

4.4.3. Validação do Modelo de Probabilidade de Regressão Logística

Cada modelo de probabilidade de regressão logística (um para cada antimicrobiano estudado) foi validado em meio de cultura e em matriz alimentícia.

Para a validação em matriz alimentícia foram utilizados leite e melão, ambos com valor de pH dentro da faixa estudada e envolvidos com surtos de listeriose.

○ Validação em Meio de Cultura

Foram empregadas quatro combinações não testadas, durante a coleta de dados para desenvolvimento do modelo (pH = 5,0, T = 20; pH = 5,0, T = 30; pH = 6,0, T = 20; pH = 6,0, T = 30).

A metodologia utilizada foi parecida com a descrita no item 4.4.1. Foram modificados apenas os valores de pH, ajustados com as soluções ácidas, e os valores de temperatura de estocagem.

○ Validação em Leite

Foram transferidos 100 mL de leite UHT integral, de forma asséptica, para duas garrafas de diluição, esterilizadas em autoclave a 121 °C por 15 min, onde foram inoculadas, aproximadamente, $1,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ de *L. monocytogenes*, para a obtenção da concentração inicial em torno de $1,0 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹. Uma garrafa foi armazenada a 12 °C, e a outra a 35 °C, e de acordo com a curva de crescimento fornecida pelo *software* PMP 7.0, para cada condição estudada (pH do leite, 6,6, e temperatura de estocagem),

periodicamente foi realizado o plaqueamento em meio oxford (Merck®) para verificar o crescimento do micro-organismo.

○ **Validação em Melão**

O melão utilizado foi higienizado e sanitizado com solução de dicloroisocianurato de sódio (Sumaveg®) na concentração de 100 mg.L⁻¹ de cloro residual total. Foram transferidos 10 g de melão (polpa), de forma asséptica, para placas esterilizadas em estufa de esterilização a 180 °C por 2 h, onde foram inoculadas aproximadamente, 1,0 x 10⁵ UFC.mL⁻¹ de *L. monocytogenes* para a obtenção da concentração inicial em torno de 1,0 x 10³ UFC.g⁻¹. As placas foram armazenadas em duas temperaturas diferentes (12 °C e 35 °C) e de acordo com a curva de crescimento fornecida pelo *software* PMP 7.0, para as condições estudadas (pH do melão, 5,9, e temperatura de estocagem), periodicamente foi realizado o plaqueamento em meio oxford para verificar o crescimento do micro-organismo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação do pH Mínimo de Crescimento de *Listeria monocytogenes* em Meio de Cultura, Frente a Diferentes Ácidos Orgânicos

As taxas de crescimento de *L. monocytogenes*, calculadas com o uso do modelo de Baranyi e Roberts, geradas para o ácido cítrico, foram maiores em relação às taxas calculadas para os demais ácidos.

Pela análise de variância, verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as taxas de crescimento de *L. monocytogenes* em diferentes ácidos. As taxas de crescimento calculadas para o ácido cítrico foram maiores ($p < 0,05$) do que as taxas calculadas para os demais ácidos, que não diferem entre si, sugerindo que este antimicrobiano é menos efetivo que os ácidos láctico e acético. Esse evento pode ser atribuído pela baixa concentração, no meio experimental, desse ácido em sua forma não dissociada, forma mais efetiva para a multiplicação microbiana. De acordo com a Tabela 1, o ácido cítrico possui menor concentração da forma não

dissociada, para todos os valores de pH, quando comparado com as concentrações dos ácidos láctico e acético.

É possível observar na Figura 2 que a raiz quadrada das taxas de crescimento de *L. monocytogenes* aumentou com o aumento do pH do meio, para os três antimicrobianos, salientando a importância do controle do pH para limitar o desenvolvimento microbiano. Controlar a taxa de crescimento dos micro-organismos é um evento de interesse da indústria alimentícia, uma vez que quanto menor a taxa de crescimento microbiana, maior será a vida de prateleira do alimento.

A Tabela 3 mostra os coeficientes dos modelos de raiz quadrada, para os ácidos láctico, acético e cítrico. As variáveis em estudo foram significativas a 0,05 de probabilidade.

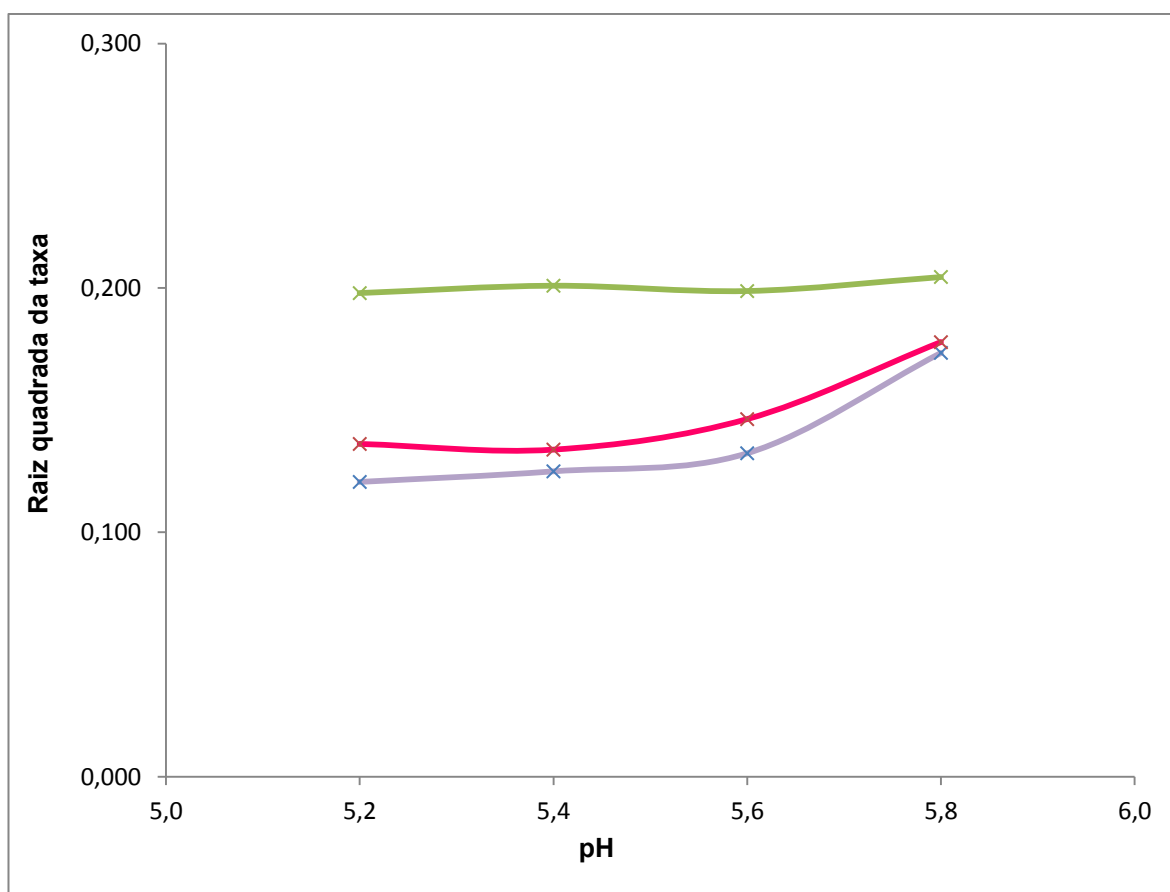


Figura 2 - Raiz quadrada da taxa de crescimento de *Listeria monocytogenes* versus pH ajustado com ácido láctico (linha roxa), ácido acético (linha rosa) e ácido cítrico (linha verde).

Tabela 3 - Coeficientes dos modelos de raiz quadrada para os ácidos láctico, acético e cítrico.

Ácido Láctico			
Variável	Estimativa	Desvio padrão	p-valor
b	0,123617	0,019648	0,000751
pH min	4,085850	0,235070	0,000000
Ácido Acético			
Variável	Estimativa	Desvio padrão	p-valor
b	0,146240	0,006080	0,000160
pH min	4,55165	0,055210	0,000000
Ácido Cítrico			
Variável	Estimativa	Desvio padrão	p-valor
b	0,147890	0,011520	0,000010
pH min	3,756120	0,144550	0,000000

Os índices estatísticos (Tabela 4) validaram os modelos ajustados. O R^2 foi acima de 0,87. O fator BIAS calculado para o modelo do ácido láctico foi de 0,9976, bem próximo de 1, o que significa que esse modelo não subestima ou superestima os valores das taxas de crescimento de *L. monocytogenes*; para o modelo do ácido acético, o valor do fator BIAS foi de 0,9578, esse modelo pode superestimar suas predições em média 4,2 %, ou seja, existe uma probabilidade de 0,042 do modelo prever valores de taxas de crescimento maiores, quando na prática se observa valores de taxas menores. A esse acontecimento dá-se o nome de predições para o lado seguro; o contrário acontece para o fator BIAS calculado para o modelo do ácido cítrico, cujo valor foi de 1,0634, o que representa em média 6,3 % de possíveis predições para o lado perigoso.

O fator exatidão encontrado foi 1,1790, 1,0441 e 1,1615 para os modelos do ácido láctico, ácido acético e ácido cítrico, respectivamente, o que sugere que os desvios médios dos valores preditos em relação aos valores observados são de 17,9 %, 4,4 % e 16,1 %, respectivamente. Esses desvios são considerados pequenos, quando se trata desse tipo de modelo. A

análise residual, apresentada na Figura 3 (ácido láctico), Figura 4 (ácido acético) e Figura 5 (ácido cítrico), confirma, através aleatoriedade das predições, que os modelos são seguros para a utilização.

Tabela 4 - Índices de validação estatística dos modelos de raiz quadrada para os ácidos láctico, acético e cítrico.

Ácidos	Fator BIAS	Fator exatidão	R ²
Láctico	0,9976	1,1790	0,8753
Acético	0,9578	1,0441	0,9945
Cítrico	1,0634	1,1615	0,9652

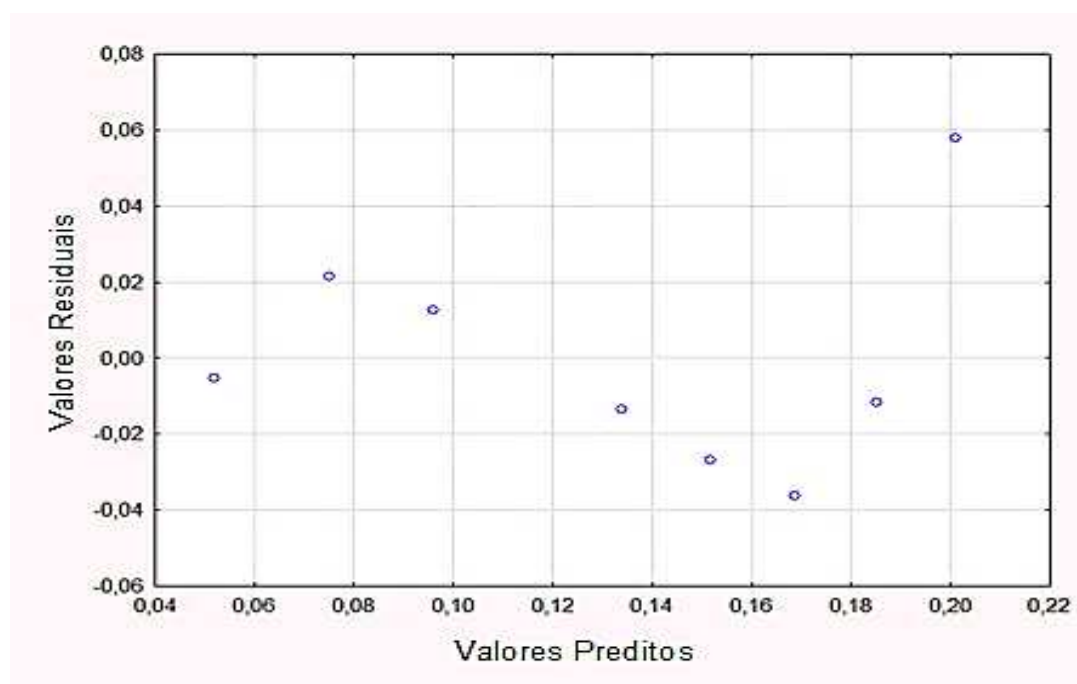


Figura 3 – Análise residual do modelo de raiz quadrada para o ácido láctico.

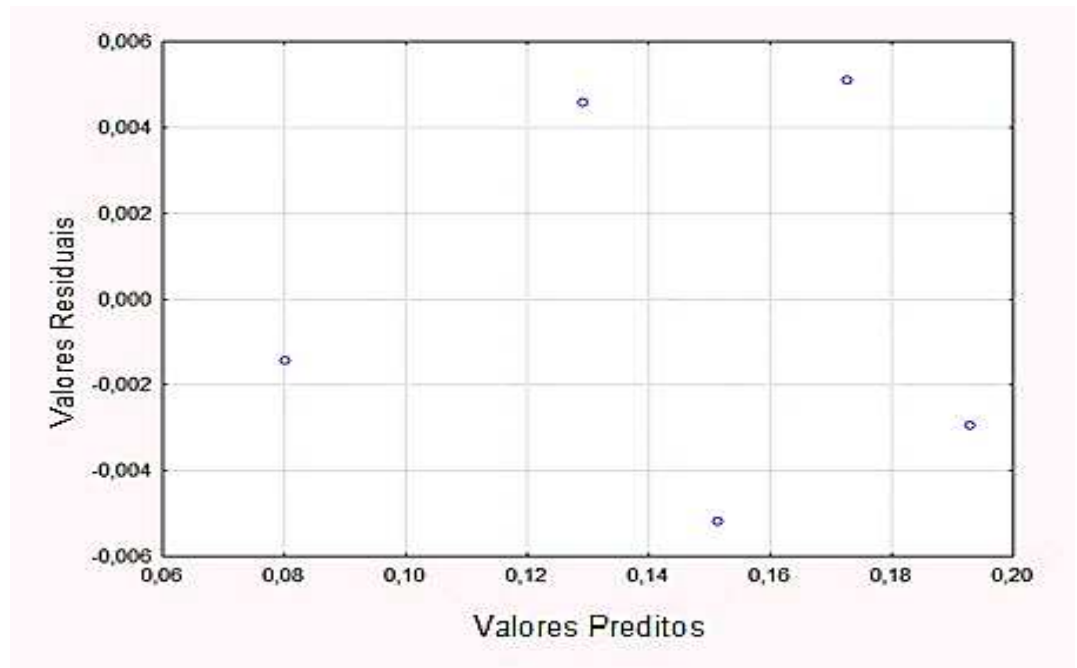


Figura 4 – Análise residual do modelo de raiz quadrada para o ácido acético.

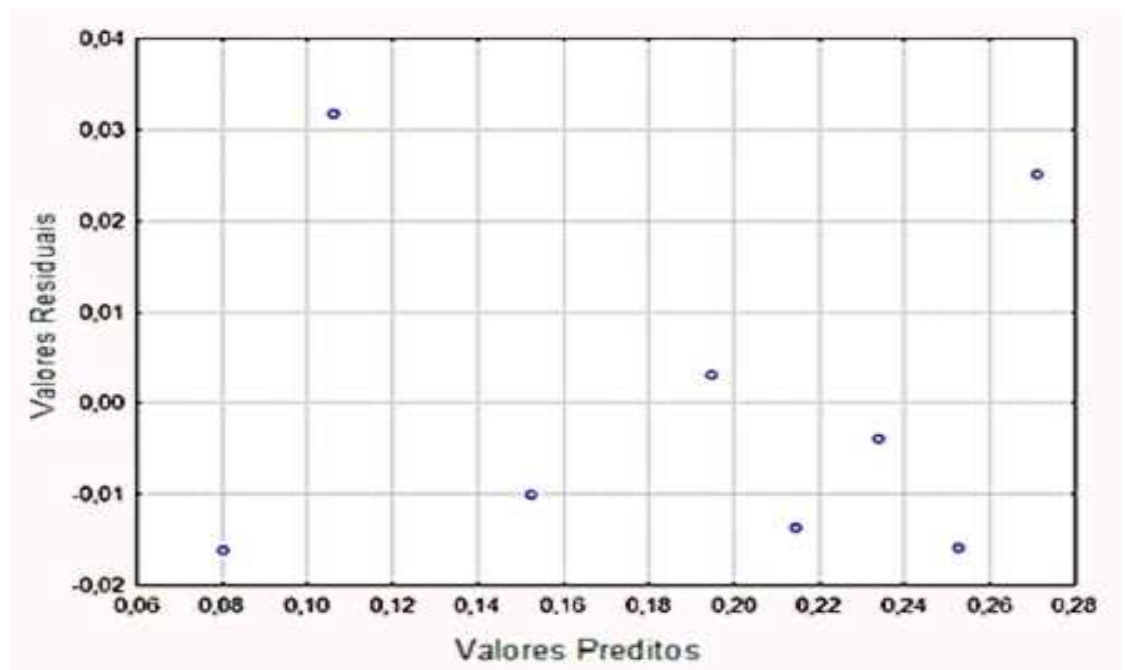


Figura 5 – Análise residual do modelo de raiz quadrada para o ácido cítrico.

Antunes (2009), encontrou 0,99, 0,9959 e 1,0379 para R^2 , fator BIAS e fator exatidão, respectivamente, em estudo do efeito da temperatura na taxa de crescimento máxima de *Klebsiella pneumoniae*, utilizando o modelo

de raiz quadrada. Penã (2005), encontrou 0,816, 1,07 e 1,28 para R², fator BIAS e fator exatidão, respectivamente, em estudo de modelagem do tempo da fase lag de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja, via modelo polinomial de superfície de resposta. Segundo Delignette-muller; Rosso; Flandrois (1995), modelos de raiz quadrada podem gerar erros médios de até 36 %, em suas predições. Modelos polinomiais, também classificados como secundário, podem apresentar erros maiores.

Os valores de pH mínimo de crescimento de *L. monocytogenes*, para cada antimicrobiano, observados experimentalmente e preditos pelos modelos de raiz quadrada, estão dispostos na Tabela 5. O pH mínimo necessário para o crescimento de *L. monocytogenes* foi menor quando o pH do meio de cultura foi ajustado com ácido cítrico, e maior quando o ajuste do pH foi realizado com ácido acético, este fato pode ser explicado pela existência da maior concentração deste ácido na forma não dissociada, quando se compara com os ácidos láctico e cítrico, o que mostra sua maior eficiência para inibir o crescimento microbiano. Adams; Little; Easter (1991), também observaram maior valor de pH mínimo quando o pH do meio foi ajustado com ácido acético, e menor valor quando o ajuste foi feito com ácido cítrico, em estudo para verificar o pH mínimo de crescimento de *Yersinia enterocolitica*.

Pode-se ressaltar que os valores preditos foram menores que os valores observados, esse fato confere a segurança no uso dos modelos, que são conservadores. Se os valores preditos fossem maiores que os observados, os modelos não seriam confiáveis.

Tabela 5 – Valores de pH mínimo de crescimento de *Listeria monocytogenes*, a 35 °C, para os ácidos láctico, acético e cítrico.

Ácidos	pH mínimo observado	pH mínimo predito
Láctico	4,6	4,1
Acético	5,0	4,6
Cítrico	4,4	3,8

5.2. Avaliação do Crescimento/não Crescimento de *Listeria monocytogenes* em meio de cultura

As Tabelas 6, 7 e 8 apresentam as respostas de crescimento de *L. monocytogenes*, obtidas durante 21 dias, em função da temperatura e do pH, ajustado com ácido láctico, ácido acético e ácido cítrico, respectivamente.

Nota-se que os fatores estudados tiveram influência nas respostas de crescimento desse micro-organismo, durante o período de incubação das amostras.

É possível observar que a combinação do menor valor de pH, utilizado no desenvolvimento dos modelos para os antimicrobianos (4,6 para ácido láctico, 5,0 para ácido acético e 4,4 para ácido cítrico), e temperaturas baixas (5 °C, 10 °C e 15 °C) conseguiu impedir o desenvolvimento microbiano durante todo o tempo de estocagem das amostras, fato não observado quando as temperaturas eram acima de 15 °C, o que confirma a afirmação de Giannuzzi (1998), que diz ser a temperatura, o fator mais importante no desenvolvimento dos micro-organismos, devido a dependência da fase lag e da taxa de crescimento por este fator ambiental. As combinações de valores de pH e temperatura elevados favoreceram o crescimento da bactéria estudada, uma vez que, nessas condições (ótimas), a fase lag diminui e a taxa de crescimento aumenta.

As informações contidas nas tabelas são de grande importância para a indústria de alimentos, que pode utilizar, em suas formulações, as combinações dos fatores que impedem o crescimento microbiano, para fornecer produtos seguros e com a maior vida útil possível.

Tabela 6 – Resposta de crescimento de *Listeria monocytogenes* em função da temperatura e do pH, ajustado com ácido láctico.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	R1	R2
1	4,6	5	0	0
2	4,6	10	0	0
3	4,6	15	0	0
4	4,6	25	1	1
5	4,6	35	1	1
6	5,5	5	0	1
7	5,5	10	1	1
8	5,5	15	1	1
9	5,5	25	1	1
10	5,5	35	1	1
11	6,5	5	1	1
12	6,5	10	1	1
13	6,5	15	1	1
14	6,5	25	1	1
15	6,5	35	1	1
16	7,0	5	1	1
17	7,0	10	1	1
18	7,0	15	1	1
19	7,0	25	1	1
20	7,0	35	1	1

R1 = crescimento (1)/não crescimento (0) de *Listeria monocytogenes* na primeira repetição; R2 = crescimento (1)/não crescimento (0) de *Listeria monocytogenes* na segunda repetição.

Tabela 7 – Resposta de crescimento de *Listeria monocytogenes* em função da temperatura e do pH, ajustado com ácido acético.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	R1	R2
1	5,0	5	0	0
2	5,0	10	0	0
3	5,0	15	0	0
4	5,0	25	1	1
5	5,0	35	1	1
6	5,8	5	0	0
7	5,8	10	1	1
8	5,8	15	1	1
9	5,8	25	1	1
10	5,8	35	1	1
11	6,6	5	1	1
12	6,6	10	1	1
13	6,6	15	1	1
14	6,6	25	1	1
15	6,6	35	1	1
16	7,0	5	1	1
17	7,0	10	1	1
18	7,0	15	1	1
19	7,0	25	1	1
20	7,0	35	1	1

R1 = crescimento (1)/não crescimento (0) de *Listeria monocytogenes* na primeira repetição; R2 = crescimento (1)/não crescimento (0) de *Listeria monocytogenes* na segunda repetição.

Tabela 8 – Resposta de crescimento de *Listeria monocytogenes* em função da temperatura e do pH, ajustado com ácido cítrico.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	R1	t2
1	4,4	5	0	0
2	4,4	10	0	0
3	4,4	15	0	0
4	4,4	25	1	1
5	4,4	35	1	1
6	5,4	5	1	0
7	5,4	10	1	1
8	5,4	15	1	1
9	5,4	25	1	1
10	5,4	35	1	1
11	6,5	5	1	1
12	6,5	10	1	1
13	6,5	15	1	1
14	6,5	25	1	1
15	6,5	35	1	1
16	7,0	5	1	1
17	7,0	10	1	1
18	7,0	15	1	1
19	7,0	25	1	1
20	7,0	35	1	1

R1 = crescimento (1)/não crescimento (0) de *Listeria monocytogenes* na primeira repetição; R2 = crescimento (1)/não crescimento (0) de *Listeria monocytogenes* na segunda repetição.

O modelo probabilístico de regressão logística foi utilizado, para cada ácido, conforme as respostas de crescimento/não crescimento de *L. monocytogenes*, com o objetivo de estimar as probabilidades de crescimento desta bactéria frente aos fatores estudados. Esse modelo foi utilizado por diversos autores, para modelar a interface de crescimento/ não crescimento microbiano, e sempre se mostrou ser muito flexível, sendo possível a inserção de outros modelos, como, o modelo de raiz quadrada e o modelo polinomial (LOPEZ-MALO; PALOU, 2000; LANCIOTTI et al., 2001; KOUTSOUMANIS; SOFOS, 2005; PEÑA, 2005; BOZIARIS et al., 2007; GYSEMANS et al., 2007; VERMEULEN et al., 2009).

As estimativas dos coeficientes dos modelos se encontram nas Tabelas 9, 10 e 11, para os ácidos láctico, acético e cítrico, respectivamente. O nível de significância utilizado foi de 0,05.

Tabela 9 – Coeficientes do modelo probabilístico de regressão logística para o ácido láctico.

Coeficiente	Variável	Estimativa	Desvio padrão	p-valor
β_0	Constante	-106,057000	15,500000	0,000000
β_1	pH	40,671100	5,217000	0,000000
β_2	T	-1,531140	0,235900	0,000000
β_3	t	-0,652532	0,070690	0,000000
β_4	pH*T	0,256482	0,038320	0,000000
β_5	pH*t	0,090715	0,009713	0,000000
β_6	T*t	0,017102	0,001788	0,000000
β_7	pH ²	-3,909710	0,450400	0,000000
β_8	t ²	-0,000020	0,000008	0,014000

T = temperatura (°C); t = tempo (h).

Tabela 10 – Coeficientes do modelo probabilístico de regressão logística para o ácido acético.

Coeficiente	Variável	Estimativa	Desvio padrão	p-valor
β_0	Constante	-290,402000	36,100000	0,000000
β_1	pH	95,437100	11,480000	0,000000
β_2	T	-1,505990	0,274600	0,000000
β_3	t	-0,350561	0,036870	0,000000
β_4	pH*T	0,233711	0,042070	0,000000
β_5	pH*t	0,047085	0,004764	0,000000
β_6	T*t	0,010379	0,000991	0,000000
β_7	pH ²	-7,869370	0,916000	0,000000
β_8	t ²	-0,000025	0,000009	0,006000

T = temperatura (°C); t = tempo (h).

Tabela 11 – Coeficientes do modelo probabilístico de regressão logística para o ácido cítrico.

Coeficiente	Variável	Estimativa	Desvio padrão	p-valor
β_0	Constante	-87,575200	11,080000	0,000000
β_1	pH	30,066900	3,551000	0,000000
β_2	T	-0,299887	0,131900	0,023000
β_3	t	-0,209910	0,022730	0,000000
β_4	pH*T	0,063713	0,021450	0,003000
β_5	pH*t	0,029362	0,002949	0,000000
β_6	T*t	0,007102	0,000674	0,000000
β_7	pH ²	-2,652260	0,290000	0,000000
β_8	t ²	-0,000027	0,000007	0,000000

T = temperatura (°C); t = tempo (h).

Os modelos probabilísticos de regressão logística, para os três antimicrobianos, se mostraram eficazes em suas predições, durante o procedimento de ajuste, demonstrando que estes podem ser utilizados com segurança para prever o crescimento/ não crescimento de *L.*

monocytogenes. As porcentagens de acertos das predições dos modelos estão apresentadas na Tabela 12.

As porcentagens globais acertadas foram 97,2 %, 95,7% e 93,6 % para os ácidos láctico, acético e cítrico, respectivamente. Os falsos positivos para o modelo do ácido láctico representaram 3,5 % e os falsos negativos, 1,9 %. Para o ácido acético, os falsos positivos corresponderam 4,1 % e os falsos negativos, 4,5 %. Para o ácido cítrico, estes valores foram de 5,3 % e 7,2 %, respectivamente. O modelo probabilístico desenvolvido por Penã (2005), teve 96,3 % de acertos globais, 8,3 % de falsos positivos e não houve falsos negativos nas predições, durante o procedimento de ajuste.

Tabela 12 – Porcentagem de acertos dos valores preditos pelos modelos probabilísticos de regressão logística, para o ácido láctico, ácido acético e ácido cítrico, no procedimento de ajuste.

Ácido Láctico	Número de ocorrências	Porcentagem de acertos
Crescimento (1)	884	98,1
Não crescimento (0)	616	96,5
Falsos positivos (1)	32	
Falsos negativos (0)	12	
Global		97,2
Ácido acético	Número de ocorrências	Porcentagem de acertos
Crescimento (1)	804	95,5
Não crescimento (0)	659	95,9
Falsos positivos (1)	38	
Falsos negativos (0)	28	
Global		95,7
Ácido cítrico	Número de ocorrências	
Crescimento (1)	837	92,8
Não crescimento (0)	606	94,7
Falsos positivos (1)	65	
Falsos negativos (0)	34	
Global		93,6

As Figuras 6, 7 e 8 retratam as probabilidades de crescimento de *L. monocytogenes*, previstas pelos modelos probabilísticos de regressão logística, desenvolvidos para os ácidos láctico, acético e cítrico, respectivamente. Essas probabilidades foram calculadas de acordo com a Equação 5, utilizando os valores de $g(x)$ para cada antimicrobiano. Para o cálculo, em diferentes combinações de temperatura e tempo de estocagem foi fixado um valor de pH (7,0). Este procedimento foi realizado por Lopez-malo; Palou (2000) e Penã (2005) e é de grande representatividade para a indústria alimentícia, que pode utilizar a modelagem probabilística para prever a probabilidade de crescimento microbiano nos alimentos, nas condições de processamento, fato que permite assegurar a qualidade dos mesmos e a saúde dos consumidores.

As probabilidades previstas foram condizentes com o observado experimentalmente. As porcentagens de acertos das previsões para os modelos dos ácidos láctico, acético e cítrico foram 91,0 %, 97,0 % e 94,0 %, respectivamente. Para o modelo probabilístico do ácido láctico, os erros obtidos nas previsões das probabilidades foram falsos positivos, ou seja, o modelo informou que houve crescimento de *L. monocytogenes* nas condições pesquisadas, quando experimentalmente não foi observado. Para o ácido acético, o erro que prevaleceu foi o falso negativo, isto é, o modelo previu o não crescimento microbiano, mas experimentalmente ocorreu. Para o ácido cítrico, 50,0 % dos erros foram falsos positivos e 50,0 % foram falsos negativos.

Nos três modelos, a probabilidade de crescimento do micro-organismo estudado foi maior, com o aumento da temperatura e do tempo de estocagem. Esse fato mostra que quanto maior o tempo de permanência de um alimento contaminado, em altas temperaturas, menor será sua vida de prateleira, sendo necessário manter os alimentos em temperaturas mais baixas, para aumentar o tempo de fase lag dos micro-organismos, e conseqüentemente, diminuir a probabilidade de crescimento, a fim de garantir maior vida útil do produto. Não houve diferença significativa, ao nível de 0,05 de probabilidade, entre os valores de probabilidades previstos para os três modelos.

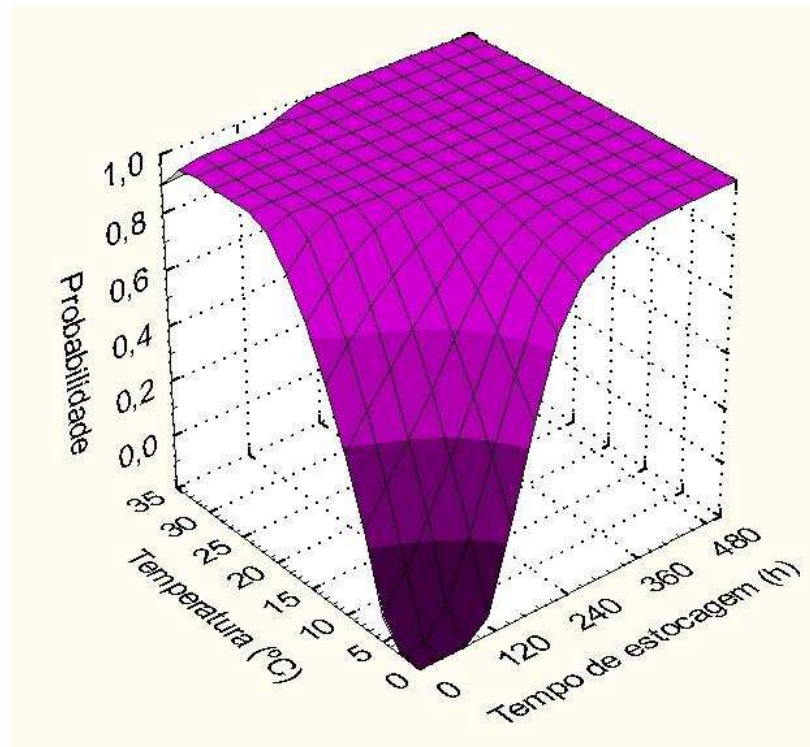


Figura 6 – Probabilidades de crescimento de *Listeria monocytogenes*, em pH 7,0, preditas pelo modelo probabilístico de regressão logística para o ácido láctico.

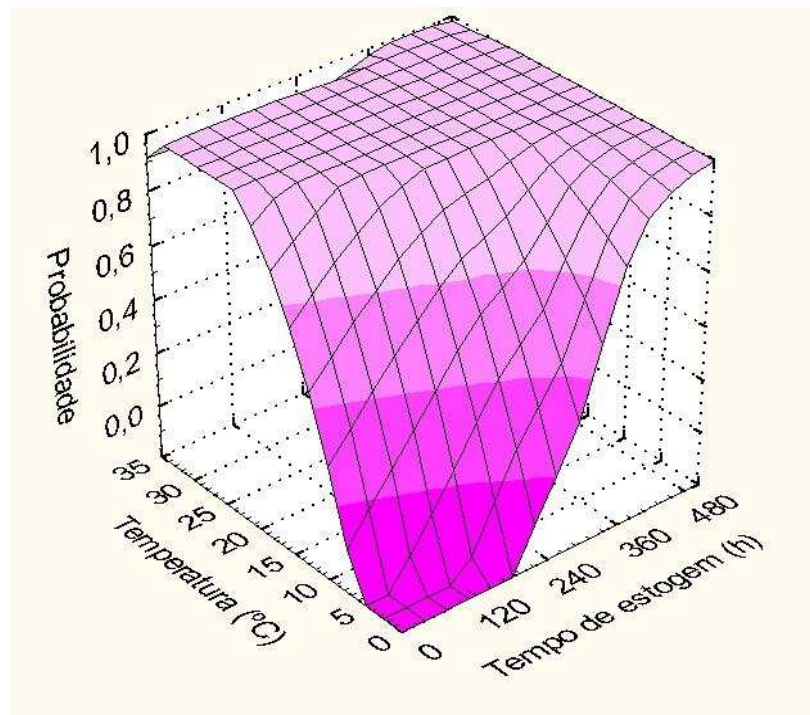


Figura 7 – Probabilidades de crescimento de *Listeria monocytogenes*, em pH 7,0, preditas pelo modelo probabilístico de regressão logística para o ácido acético.

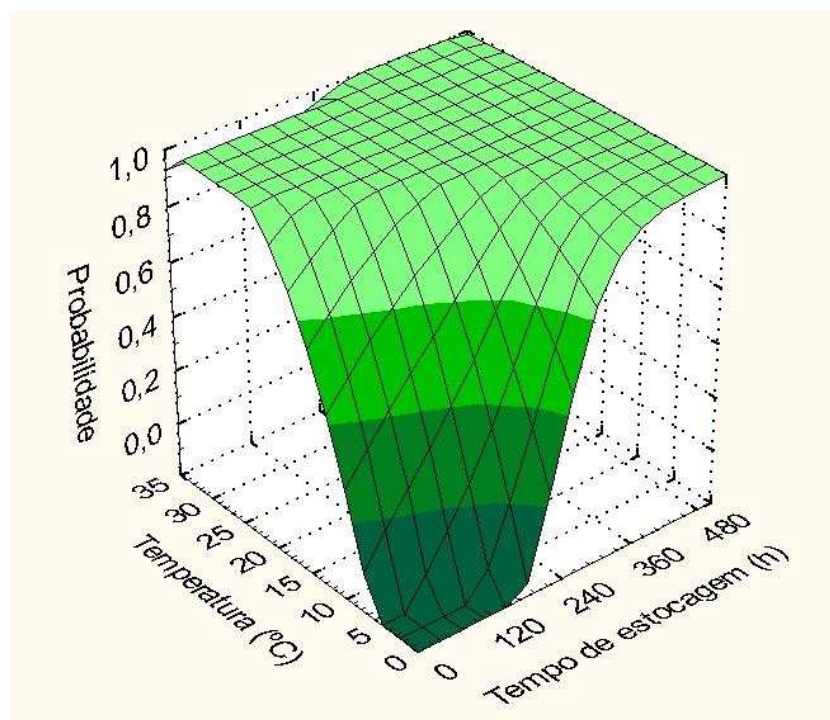


Figura 8 – Probabilidades de crescimento de *Listeria monocytogenes*, em pH 7,0, preditas pelo modelo probabilístico de regressão logística para o ácido cítrico.

Os valores críticos de tempo de estocagem, ou seja, valores mínimos de tempo onde ocorre o desenvolvimento microbiano, preditos pelos modelos probabilísticos, com probabilidades de crescimento de 0,5, 0,1 e 0,05, estão representados na Tabela 13.

Para a realização das predições, foi utilizado a Equação 5, com os respectivos valores de $g(x)$ para cada ácido. Para o cálculo em diferentes combinações de temperatura e pH, foram fixados os valores de probabilidades (0,5, 0,1 e 0,05). Esse artifício é muito importante para a indústria de alimentos, que pode utilizar a modelagem probabilística para determinar, de forma segura, a vida útil de seus produtos.

Nas predições de todos os modelos é possível observar que os valores de tempo preditos foram menores quando a probabilidade de 0,05 foi utilizada nos cálculos. Segundo Lopez-malo; Palou (2000), a margem de segurança é maior quando são utilizados valores menores de probabilidade.

Outro fato que pode ser constatado é que os valores de tempo de estocagem crítico, preditos pelo modelo do ácido acético, foram maiores do

que os valores preditos pelos modelos dos demais ácidos, em pH 5,0. Em pH 6,5 a maior parte das predições ficaram menores do que as predições feitas pelos modelos dos ácidos láctico e cítrico. Como o ácido acético é muito utilizado em alimentos ácidos, nessa condição, ele é melhor do que os outros antimicrobianos. Em pH 6,5 o ácido láctico tem o melhor desempenho.

A realização da ANOVA, a 0,05 de probabilidade, revelou que houve diferença significativa entre os valores de tempo preditos por todos os modelos. O teste de Tukey, a 0,05 de probabilidade, indicou que os valores de tempo de estocagem crítico, calculados pelo modelo do ácido acético, diferem dos valores calculados pelos outros modelos, que não diferem entre si, sugerindo que o ácido acético tende a ser melhor que os demais antimicrobianos. Esse fato pode ser explicado pela elevada concentração desse ácido, em sua forma não dissociada, o que garante sua maior efetividade perante aos outros ácidos. Por exemplo, quando o meio de cultura foi ajustado para pH 5,0, utilizando o ácido acético, a concentração desse ácido na forma não dissociada, forma mais efetiva para a ação antimicrobiana dos ácidos, foi de $1,513 \text{ g.L}^{-1}$, valor maior, quando se compara com a concentração dos demais antimicrobianos, no mesmo valor de pH, $0,327 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,103 \text{ g.L}^{-1}$, para os ácidos láctico e cítrico, respectivamente. De acordo com as Tabelas 1 e 2, o ácido acético possui maior concentração da forma não dissociada para todos os valores de pH, quando comparado com os ácidos láctico e cítrico, porém, quando o pH aumenta, essa diferença diminui, esse fato pode explicar a diminuição da eficiência das predições realizadas pelo modelo desse ácido.

Tabela 13 – Tempos de estocagem críticos (h) preditos pelos modelos probabilísticos de regressão logística para os ácidos láctico, acético e cítrico.

pH	T (°C)	t (h) P = 0,50	t (h) P = 0,10	t (h) P = 0,05
Ácido Láctico				
5,0	15	73	34	21
5,0	20	38	23	17
5,0	25	29	20	16
5,0	30	25	18	16
6,5	15	25	14	10
6,5	20	15	7	4
6,5	25	10	4	1
6,5	30	6	1	<1
Ácido Acético				
5,0	15	370	316	298
5,0	20	181	157	149
5,0	25	127	112	107
5,0	30	102	91	87
6,5	15	21	1	<1
6,5	20	14	1	<1
6,5	25	10	<1	<1
6,5	30	8	<1	<1
Ácido Cítrico				
5,0	15	75	25	7
5,0	20	40	12	3
5,0	25	27	8	1
5,0	30	20	5	<1
6,5	15	28	3	<1
6,5	20	16	<1	<1
6,5	25	8	<1	<1
6,5	30	4	<1	<1

Os valores críticos da temperatura de estocagem, ou seja, valores mínimos de temperatura em que ocorre o crescimento microbiano,

calculados pelos modelos de probabilidade de regressão logística, com probabilidades de crescimento microbiano de 0,5, 0,1 e 0,05, estão expostos na Tabela 14.

Para a realização dos cálculos, foi utilizado a Equação 5 e os valores de $g(x)$ encontrados para cada ácido. As probabilidades foram fixadas (0,5, 0,1 e 0,05) para a realização das predições em diferentes combinações de pH e tempo de estocagem.

Em todas as predições é possível observar que para retardar o crescimento de *L. monocytogenes* é preciso manter o meio, contendo o micro-organismo, em temperaturas baixas. Quando o pH decresce, a temperatura crítica de estocagem aumenta. Essas observações também foram feitas por Lanciotti et al., (2001), ao estudar a interface de crescimento/ não de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis*, em função do efeito da atividade de água, pH, temperatura e concentração de etanol. O entendimento desses acontecimentos ajuda na implementação das tecnologias de barreiras na indústria de alimentos.

As temperaturas preditas pelo modelo do ácido acético são maiores que as temperaturas preditas pelos modelos dos outros ácidos.

A realização da ANOVA, a 0,05 de probabilidade, revelou que houve diferença significativa entre os valores de temperatura, preditos para todos os modelos. O teste de Tukey, a 0,05 de probabilidade, indicou que os valores de temperatura de estocagem crítico, preditos pelo modelo do ácido acético, diferem dos valores preditos pelo modelo do ácido cítrico, sugerindo que o primeiro ácido é melhor antimicrobiano que o segundo. Quando estes dois antimicrobianos são comparados, em relação à concentração de suas formas não dissociadas, presentes no meio experimental, apresentados nas Tabelas 1 e 2, é possível observar que as concentrações da forma mais efetiva para inibir o crescimento microbiano, são maiores para o ácido acético, o que garante sua maior efetividade perante ao ácido cítrico.

Tabela 14 – Temperaturas de estocagem crítica (°C) previstas pelos modelos probabilísticos de regressão logística para os ácidos láctico, acético e cítrico.

pH	t(h)	T (°C) P =	T (°C) P =	T (°C) P =
		0,50	0,10	0,05
Ácido Láctico				
5,0	120	13	12	12
5,0	240	12	12	12
5,0	360	12	12	12
5,0	480	12	12	12
6,5	120	7	6	5
6,5	240	5	5	4
6,5	360	5	4	4
6,6	480	4	4	4
Ácido Acético				
5,0	120	26	24	23
5,0	240	17	16	16
5,0	360	15	14	14
5,0	480	14	14	13
6,5	120	6	5	4
6,5	240	5	4	4
6,5	360	5	4	4
6,6	480	5	4	4
Ácido Cítrico				
5,0	120	13	10	9
5,0	240	11	10	9
5,0	360	10	9	9
5,0	480	10	9	9
6,5	120	7	4	4
6,5	240	5	4	3
6,5	360	4	3	3
6,6	480	4	3	3

Ao analisar a Figura 9 é possível perceber a importância do modelo de probabilidade de regressão logística para o controle de risco dos produtos alimentícios. Com esse tipo de modelagem é possível prever o comportamento microbiano para determinadas situações e escolher a condição, ou seja, a combinação dos fatores intrínsecos e extrínsecos, que favorece o aumento da fase lag, o que proporciona maior segurança do alimento.

A figura mostra a existência de um limiar entre crescimento e não crescimento do micro-organismo estudado. Quando o ácido láctico é utilizado para ajustar o pH do meio para 5,5, e este é mantido a 10 °C, a probabilidade de não crescimento do patógeno estudado está entre 10 % e 50 %. Se o mesmo meio for mantido a 15 °C, a probabilidade de crescimento será maior que 90 %. Por esse motivo, essa figura é importante para que se possa fazer a conscientização dos manipuladores de alimentos, que muitas vezes são descrentes da existência de micro-organismos, pela falta de conhecimento. Pode-se demonstrar que quando um alimento de baixa acidez, contaminado por descuidos durante o processamento, for mantido em temperaturas inadequadas, a probabilidade de multiplicação microbiana é aumentada. Essa demonstração de interface de crescimento/ não crescimento microbiano também foi utilizada por Bozaris et al. (2007), na investigação do efeito do sal na interface de crescimento/ não crescimento de *L. monocytogenes*, em diferentes valores de pH e concentrações de nisina, e por Vermeulen et al. (2009), em estudo da influência do nível do inóculo na interface de crescimento/ não crescimento de *L. monocytogenes*, em função do pH, atividade de água e ácido acético.

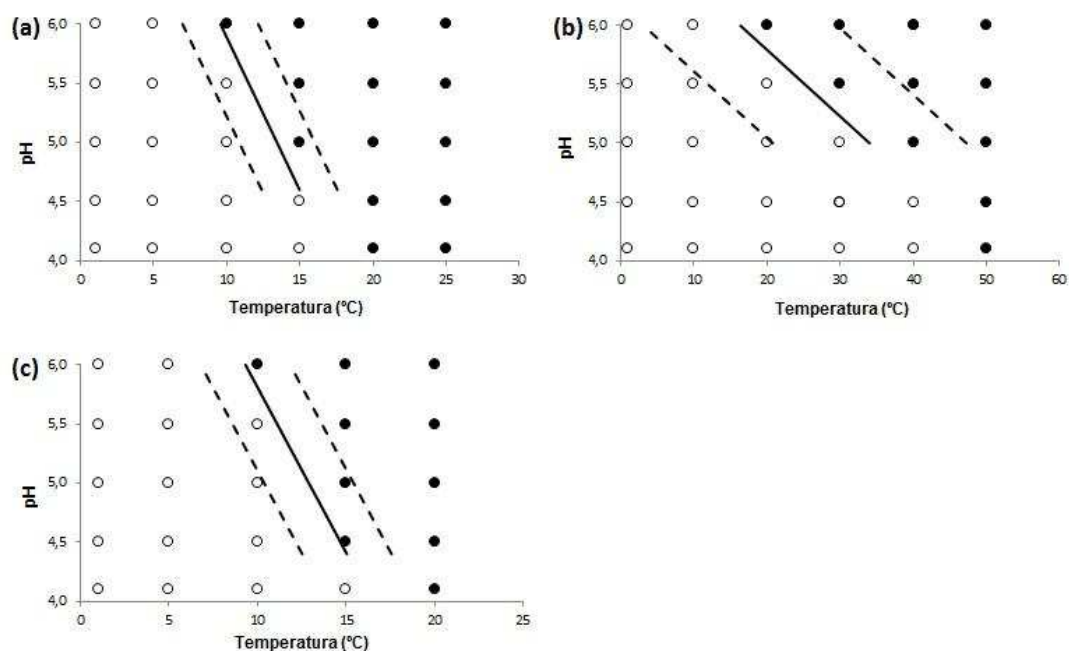


Figura 9 – Predição de interface de crescimento/não crescimento de *Listeria monocytogenes* em relação a pH e temperatura, para ácido láctico (a), ácido acético (b) e ácido cítrico (c), em 72 h de estocagem e probabilidades de 0,5 (linha sólida), 0,1 (linha tracejada inferior) e 0,9 (linha tracejada superior). Círculos sem preenchimento representam o não crescimento do micro-organismo estudado e círculos com preenchimento, o crescimento.

5.2.1. Validação dos Modelos de Probabilidade de Regressão Logística

Os resultados da validação dos modelos probabilísticos são encontrados nas Tabelas 15, 16 e 17, para os ácidos láctico, acético e cítrico, respectivamente.

Pode ser observado que os modelos acertaram a grande maioria das predições de crescimento/ não crescimento de *L. monocytogenes*, isso mostra a confiabilidade dos mesmos. O modelo probabilístico do ácido láctico acertou 92,3 % das predições; dentre os erros obtidos, 50,0 % eram falsos positivos e 50,0 %, falsos negativos. O modelo do ácido acético obteve 80,8 % de acertos; 20,0 % dos erros foram falsos positivos e 80,0 %, falsos negativos. O modelo do ácido cítrico acertou 88,5 % das predições; entre os erros obtidos, 66,7 % eram falsos positivos e 33,3 %, falsos negativos. A

validação em matriz alimentícia confirma que os modelos podem ser utilizados para prever o comportamento de *L. monocytogenes* em alimentos, com valores de pH dentro da faixa utilizada na construção dos modelos. As predições dos modelos dos ácidos láctico e cítrico foram 100 % corretas na validação utilizando melão como matriz, fato que reafirma a efetividade desses modelos.

Segundo Mcmeekin et al. (1993), a validação em matriz alimentícia, dos modelos desenvolvidos em meio de cultura, é muito importante para a garantia de utilização desses modelos, uma vez que o meio de cultura não representa fielmente as condições reais de um alimento. A não validação em alimentos pode trazer resultados não confiáveis para os modelos desenvolvidos.

Tabela 15 – Probabilidades de crescimento pelo modelo do ácido láctico.

pH	T (°C)	t (h)	Probabilidade predita	Observação
Meio de cultura				
5,0	20	0	0	0
5,0	20	5	0	0
5,0	20	23	0	0
6,0	20	0	0	0
6,0	20	5	0	0
6,0	20	23	1	1
5,0	30	0	0	0
5,0	30	5	0	0
5,0	30	23	0	1
6,0	30	0	0	0
6,0	30	5	0	0
6,0	30	23	1	1
Leite				
6,6	12	0	0	0
6,6	12	24	0	0
6,6	12	48	1	1
6,6	35	0	0	0
6,6	35	5	1	0
6,6	35	8	1	1
6,6	35	24	1	1
Melão				
5,7	12	0	0	0
5,7	12	24	0	0
5,7	12	48	1	1
5,7	12	72	1	1
5,7	35	0	0	0
5,7	35	8	1	1
5,7	35	24	1	1

Tabela 16 – Probabilidades de crescimento pelo modelo do ácido acético.

pH	T (°C)	t (h)	Probabilidade predita	Observação
Meio de cultura				
5,5	20	0	0	0
5,5	20	31	0	0
5,5	20	96	1	1
6,0	20	0	0	0
6,0	20	23	1	0
6,0	20	31	1	1
5,5	30	0	0	0
5,5	30	23	0	0
5,5	30	48	1	1
6,0	30	0	0	0
6,0	30	23	1	1
6,0	30	48	1	1
Leite				
6,6	12	0	0	0
6,6	12	24	0	0
6,6	12	48	1	1
6,6	35	0	0	0
6,6	35	5	0	0
6,6	35	8	1	1
6,6	35	24	1	1
Melão				
5,7	12	0	0	0
5,7	12	24	0	0
5,7	12	48	0	1
5,7	12	72	0	1
5,7	35	0	0	0
5,7	35	8	0	1
5,7	35	24	0	1

Tabela 17 – Probabilidades de crescimento pelo modelo do ácido cítrico.

pH	T (°C)	t (h)	Probabilidade predita	Observação
Meio de cultura				
5,0	20	0	0	0
5,0	20	23	0	0
5,0	20	31	0	1
6,0	20	0	0	0
6,0	20	23	1	1
6,0	20	31	1	1
5,0	30	0	0	0
5,0	30	5	0	0
5,0	30	23	1	1
6,0	30	0	0	0
6,0	30	5	1	0
6,0	30	23	1	1
Leite				
6,6	12	0	0	0
6,6	12	24	0	0
6,6	12	48	1	1
6,6	35	0	0	0
6,6	35	5	1	0
6,6	35	8	1	1
6,6	35	24	1	1
Melão				
5,7	12	0	0	0
5,7	12	24	0	0
5,7	12	48	1	1
5,7	12	72	1	1
5,7	35	0	0	0
5,7	35	8	1	1
5,7	35	24	1	1

6. CONCLUSÃO

O pH mínimo necessário para o crescimento de *L. monocytogenes* foi menor, 4,4, quando o pH do meio de cultura foi ajustado com ácido cítrico, e maior, 5,0, quando o ajuste do pH foi realizado com ácido acético.

Os modelos de raiz quadrada, gerados para cada antimicrobiano pesquisado, foram importantes para as previsões dos valores de pH mínimo de crescimento de *L. monocytogenes*. As previsões desses modelos foram menores que os valores observados, o que mostra a segurança dos modelos.

Os modelos probabilísticos de regressão logística, determinados para cada ácido analisado, foram ferramentas essenciais para prever o comportamento de *L. monocytogenes* frente aos fatores estudados. A utilização desses modelos é muito útil na indústria alimentícia, uma vez que auxilia na escolha da formulação que retarda ao máximo o crescimento microbiano, assegurando maior vida de prateleira dos alimentos e a saúde do consumidor.

A validação dos modelos probabilísticos de regressão logística, em meio de cultura e em matriz alimentícia, comprovou a confiabilidade e a versatilidade desses, demonstrando que os mesmos podem ser utilizados para prever o comportamento de *L. monocytogenes* dentro dos limites dos fatores estudados.

Dentre os antimicrobianos investigados no estudo, o ácido acético foi o mais efetivo, e o ácido cítrico o menos efetivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. R.; LITTLE, C. L.; EASTER, M. C. Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, n. 1, p. 65–71, 11 jul. 1991.

ADITIVOS & INGREDIENTES. Os conservantes mais utilizados em alimentos. p. 68, jun. 2015a.

ADITIVOS & INGREDIENTES. Acidulantes. p. 60, out. 2015b.

ANDERSON, M. R. P.; PASCUAL, V. C. **Microbiología alimentária: metodología analítica para alimentos y bebidas**. 2ª. ed. Espanha: Días de Santos, S. A, 2000.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Livraria Varela, 2006.

ANTUNES, A. **Setores da indústria: química orgânica**. Rio de Janeiro: E-papers Ltda, 2007.

ANTUNES, M. A. **Contaminação, crescimento e inativação de microrganismos na cadeia de produção de alface (*Lactuca sativa* L.) variedade vitória de santo antão**. 2009. Universidade Federal de Viçosa, 2009.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 6ª. ed. Viçosa: UFV, 2015.

BARANCELLI, G. V.; SILVA-CRUZ, J. V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos Lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arq. Inst. Biol.**, v. 78, p. 155–168, 2011.

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, 1994.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Predictive microbiology - quantitative microbial ecology. n. March, p. 1 – 7, 2004.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 1, p. 1–20, 2004.

BEILEN, J. W. A. V.; MATTOS, M. J. T.; HELLINGWERF, K. J.; BRUL, S. Distinct effects of sorbic acid and acetic acid on the electrophysiology and metabolism of *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 19, p. 5918–5926, 2014.

BESSE, N. G.; AUDINET, N.; BARREA, L.; CAUQUIL, A.; CORNU, M.; COLIN, P. Effect of the inoculum size on *Listeria monocytogenes* growth in structured media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, n. 1, p. 43–51, 2006.

BLACKBURN, C. W. Modelling shelf-life. In: **The sustainability and shelf-life of food**. Cambridge: CRC Press LLC, 2000. p. 55–75.

BOZIARIS, I. S.; SKANDAMIS, P. N.; ANASTASIADI, M.; NYCHAS, G. J. E. Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 796–805, 2007.

BRADEN, C. R.; TAUXE, R. V. Emerging trends in foodborne diseases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 27, n. 3, p. 517–533, 2013.

BRASIL. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos**. São Paulo. Ministério da Saúde, 2014.

CARMELO, V.; SANTOS, H.; SÁ-CORREIA, I. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1325, n. 1, p. 63–70, 1997.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. **Vital Signs: Listeria Illnesses, Deaths, and Outbreaks**. United States, 2014.

COMBASE. **Combined Database for Predictive Microbiology**. Disponível em: <<http://www.combase.cc/index.php/en/tools>>.

DELIGNETTE-MULLER, M. L.; ROSSO, L.; FLANDROIS, J. P. Accuracy of microbial growth predictions with square root and polynomial models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, n. 2-3, p. 139–146, 1995.

DODDS, K. L. An introduction to predictive microbiology and the development and use of probability models with *Clostridium botulinum*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 12, n. 3-5, p. 139–143, 1993.

DOGANAY, M. Listeriosis: clinical presentation. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 173–175, 2003.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2^a. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

FAKRUDDIN, M.; MAZUMDAR, R. M.; MANNAN, K. S. Bin. Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. **Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)**, v. 40, n. 2, p. 121–131, 2012.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de alimentos**. 4^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FERREIRA, M.; MORAIS, L.; NICHELE, T. Z.; PINO, J. C. **Química orgânica**. 3^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

FOOD AND AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **Compliance Policy Guide Guidance for FDA Staff Sec. 555.320 *Listeria monocytogenes***, 2008.

FORSYTHE, S. J. **Alimentos seguros: microbiologia**. Espenha: Acribia, S. A., 2003.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. v. 113, p. 1–15, 2007.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2009.

GEDDE, M. M. .; HIGGINS, D. E. .; TILNEY, L. G. .; PORTNOY, D. A. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 999–1003, 2000.

GIANNUZZI, L. Mathematical modeling of microbial growth in fresh filled pasta stored at different temperatures. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 22, n. 6, p. 433–447, 1998.

GOLDEN, D. A.; BEUCHAT, L. R.; LARY HITCHCOCK, H. Changes in fatty acid composition of various lipid components of *Zygosaccharomyces rouxii* as influenced by solutes, potassium sorbate and incubation temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 293–303, 1994.

GORTMAKER, S. L.; HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression. Contemporary Sociology**, 1994.

GYSEMANS, K. P. M.; BERNAERTS, K.; VERMEULEN, A.; GEERAERD, A. H.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F.; VAN IMPE, J. F. Exploring the performance of logistic regression model types on growth/no growth data of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 316–331, 2007.

HAIR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada dos dados**. 6^a. ed. [s.l.] Bookman, 2009.

HOLT, J. J. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed.

HUANG, L. A new mechanistic growth model for simultaneous determination of lag phase duration and exponential growth rate and a new Belehdrádek-type model for evaluating the effect of temperature on growth rate. **Food Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 770–776, 2011.

JAKOBSEN, B. K.; PELHAM, H. R. A conserved heptapeptide restrains the activity of the yeast heat shock transcription factor. **The EMBO journal**, v. 10, n. 2, p. 369–75, 1991.

JAY, M. J. **Microbiologia de alimentos**. 6^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

JEYALETCHUMI, P.; TUNUNG, R.; MARGARET, S. P.; SON, R.; FARINAZLEEN, M. G.; CHEAH, Y. K. Review Article Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **International Food Research Journal**, v. 11, p. 1–11, 2010.

KATES, M.; BAXTER, R. M. Lipid composition of mesophilic and psychrophilic yeasts (*Candida* species) as influenced by environmental temperature. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 40, n. 9, p. 1213–1227, 1 set. 1962.

KOUTSOUMANIS, K. P.; SOFOS, J. N. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and *a_w* limits for growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 83–91, 2005.

KRIST, K. A.; ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Final optical density and growth rate; effects of temperature and NaCl differ from acidity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 195–203, 1998.

KUCHENMÜLLER, T.; HIRD, S.; STEIN, C.; KRAMARZ, P. NANDA, A.; HAVELAAR, A. H. Estimating the global burden of foodborne diseases—a collaborative effort. Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin. 2009.

LANCIOTTI, R.; SINIGAGLIA, M.; GARDINI, F.; VANNINI, L.; GUERZONI, M. E. Growth / no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity , pH , temperature and ethanol concentration. **Food Microbiology**, v. 1, n. 18, p. 659–668, 2001.

LEPAGE, C.; FAYOLLE, F.; HERMANN, M.; VANDECASTEELE, J. P. Changes in membrane lipid composition of *Clostridium acetobutylicum* during acetone-butanol fermentation: effects of solvents, growth temperature and pH. **Microbiology**, v. 133, n. 1987, p. 103–110, 1987.

LOPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Modeling the growth/no growth interface of *Zygosaccharomyces bailii* in mango puree. **Journal of food science**, v. 65, n. 3, p. 516–520, 2000.

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 713–721, 2012.

MCMEEKIN, T. A.; OLLEY, J.; ROSS, T.; RATKOWSKY, D. A. **Predictive**

microbiology: theory and application. Taunton: Research Studies Press Ltd., 1993.

MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T.; OLLEY, J. Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products. **International journal of food microbiology**, v. 15, n. 1-2, p. 13–32, 1992.

MÉTRIS, A.; GEORGE, S. M.; PECK, M. W.; BARANYI, J. Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, n. 3, p. 821–827, 2003.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of food technology**, v. 3, p. 41–51, 2000.

PEÑA, W. E. L. **Uso de modelos preditivos no crescimento e inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã.** 2005. Universidade Estadual de Campinas, 2005.

PMP. **Pathogen Modeling Program.** Disponível em: <<http://pmp.errc.ars.usda.gov/>>.

RATKOWSKY, D. A.; OLLEY, J.; MCMEEKIN, T. A.; BALL, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 149, n. 1, p. 1–5, 1982.

ROSS, T., MCMEEKIN, T. A. Predictive microbiology: applications of a square root model. **Food Australia**, v. 43, p. 202–207, 1991.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 81, p. 501–508., 1996.

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

RUSSELL, N. J. Bacterial membranes: The effects of chill storage and food processing. An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 1-2, p. 27–34, 2002.

RUSSELL, N. J.; EVANS, R. I.; TER STEEG, P. F.; HELLEMONS, J.; VERHEUL, A.; ABEE, T. Membranes as a target for stress adaptation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 255–261, 1995.

SALTINI, R.; AKKERMAN, R. Testing improvements in the chocolate traceability system: Impact on product recalls and production efficiency. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 221–226, 2012.

SAVOV, A. .; KOUZMANOV, G. B. Food quality and safety standards at a glance. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 23, n. 4, p.

1462–1468, 2014.

SCHODER, D. *Listeria*: Listeriosis. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. B. T.-E. OF F. AND H. (Ed.). Oxford: Academic Press, 2016. p. 561–566.

SOERENSEN, B.; MARULLI, K. B. B. **Manual de saúde pública**. São Paulo: Arte e Ciência, 1999.

SOUZA, P. B. A. **Avaliação de *Listeria monocytogenes* em melão e jabuticaba**. Viçosa, 2014.

STRATFORD, M.; NEBE-VON-CARON, G.; STEELS, H.; NOVODVORSKA, M.; UECKERT, J.; ARCHER, D. B. Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 3, p. 164–171, 2013.

TILNEY, L. G. ; PORTNOY, D. A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. **J.Cell Biol.**, v. 109, n. October, p. 1597–1608, 1989.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. ; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10^a. ed. Porto Alegre: Artimed, 2012.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. ; KUHN, M. ; BERCHE, P. ; CHAKRABORTY, T. ; DOMI, G. ; GONZÁLEZ-ZORN, B. ; WEHLAND, J. . *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 3, p. 584–640, 2001.

VÁZQUEZ-BOLANDA, J. A.; DOMÍNGUEZ-BERNALA, G. ; GONZÁLEZ-ZORNA, B. ; KREFTB, J. ; GOEBEL, W. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 7, p. 571–584, 2001.

VERMEULEN, A.; GYSEMANS, K. P. M.; BERNAERTS, K.; GEERAERD, A. H.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F.; VAN IMPE, J. F. Modelling the influence of the inoculation level on the growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* as a function of pH, aw and acetic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 2, p. 83–89, 2009.

WHITING R. C.; BUCHANAN L. R. Microbial modelling. **Food Technol**, v. 48, p. 113–120, 1994.

WHITING, R. C. Microbial database buiding: what have we learned? **Food Technol**, 1997.

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R, L. Predictive modeling. In: **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: Press, ASM, 1997. p. 728–739.

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. A classification of models for predictive microbiology. **Food Microbiol**, v. 10, p. 175–177, 1993.