



# CATÓLICA

## ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

---

PORTO

Efeito de flutuações de temperatura durante o armazenamento de alimentos prontos para consumo (fiambre) na sobrevivência e crescimento de *Listeria monocytogenes*

por

Mariana Pinto Pêgas Ferreira da Silva

novembro 2019



# CATÓLICA

## ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

---

PORTO

Efeito de flutuações de temperatura durante o armazenamento de alimentos prontos para consumo (fiambre) na sobrevivência e crescimento de *Listeria monocytogenes*

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Inovação

por

Mariana Pinto Pêgas Ferreira da Silva

Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Orientadora: Professora Doutora Paula Cristina Maia Teixeira

Coorientadora: Doutora Vânia Alexandra Borges Ferreira

novembro 2019



## Resumo

Este estudo teve como principal objetivo avaliar o comportamento de diferentes estirpes de *Listeria monocytogenes* em fiambre de porco sujeito a oscilações de temperatura durante um período de sete dias. Foi ainda objetivo do trabalho comparar os resultados obtidos experimentalmente com o comportamento de *L. monocytogenes* previsto utilizando softwares de microbiologia preditiva.

Foram realizadas duas experiências durante os mês de maio e julho, cada uma delas envolveu a realização de dois ensaios independentes. Durante a 1ª e 2ª experiências realizadas no mês de maio e julho, com exceção do 2º ensaio referente à 2ª experiência, observaram-se oscilações no crescimento de *L. monocytogenes* ao longo dos 7 dias de estudo. No entanto, no 2º ensaio realizado em julho o desenvolvimento de *L. monocytogenes* já terá sido mais uniforme e constante ao longo do tempo, chegando a atingir valores na ordem dos 6 log UFC/g nas condições de abuso mais elevada (ex.: Lm Real 16h a 25° C e Lm Real 24h a 25° C). Nos restantes ensaios, no final de 7 dias de estudo não se atingiram valores superiores a 4 log UFC/g.

Em ambas as experiências realizadas, foram detetadas bactérias do ácido láctico em elevado número (ex.: valores acima dos 4 log UFC/g) e uma redução dos valores de pH ao longo dos 7 dias de estudo. Quando analisados os resultados gerados pelos modelos preditivos constatou-se que de acordo com o modelo ComBase o crescimento é contínuo ao longo do tempo e proporcional a cada abuso de temperatura a que *L. monocytogenes* foi sujeita. Quando utilizado o modelo *Food Spoilage and Safety Predictor* (FSSP), observou-se um crescimento constante até aproximadamente ao 2º dia e a partir daí foi exibida uma fase estacionária.

Conclui-se que o fiambre de porco sustenta o desenvolvimento de *L. monocytogenes*. Constatou-se que no final de cada 7 dias de estudo as temperaturas de abuso não seriam o fator mais relevante para o crescimento, mas sim o tempo de exposição. Concluiu-se também que as bactérias do ácido láctico influenciam o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em fiambre. De entre os modelos de microbiologia preditiva utilizados neste estudo, destaca-se o FSSP, uma vez que é o modelo cujas previsões mais se aproximam dos resultados laboratoriais.

**Palavras-chave:** *Listeria monocytogenes*, alimentos prontos a comer, armazenamento, flutuações de temperatura, fiambre, microbiologia preditiva



## Abstract

The main objective of this study was to evaluate the behavior of different *Listeria monocytogenes* strains in pork ham exposed temperature fluctuations over a seven-day period. This work also aimed to compare results obtained experimentally with the behavior of *L. monocytogenes* predicted using predictive microbiology software.

Two experiments were carried out during May and July, each of them involved two independent trials. During the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> experiments conducted in May and July, with the exception of the 2<sup>nd</sup> trial referring to the 2<sup>nd</sup> experiment, oscillations in the growth of *L. monocytogenes* were observed during the 7 days of study. However, in the 2<sup>nd</sup> trial carried out in July the development of *L. monocytogenes* was more uniform and constant over time, reaching values in the order of 6 log CFU/g in the conditions of higher abuse (e.g. Lm Real 16 h to 25 °C and Lm Real 24 h to 25 °C). In the other trials, at the end of 7 days of study, values higher than 4 log CFU/g were not reached.

In both experiments, lactic acid bacteria were found in high numbers (e.g., values above 4 CFU/g log) and a reduction in pH values over the 7 days of study was observed. When analyzed the results generated by predictive models it was found that according to the *ComBase* model, growth is continuous over time and proportional to each temperature abuse to which *L. monocytogenes* was subjected. When using the *Food Spoilage and Safety Predictor* (FSSP) model, there was constant growth until approximately day 2 and then stationary phase was reached.

It was concluded that the pork ham supports the development of *L. monocytogenes*. However, it was possible to verify at the end of 7 days of study that abuse temperatures were not the most relevant factor for growth, but exposure time. It was also concluded that lactic acid bacteria influence the development of *L. monocytogenes*. Among the predictive microbiology models used in this study, the FSSP stands out, since it is the model that most closely approaches the reality observed in the laboratory.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, ready-to-eat (RTE), storage, temperature fluctuations, cooked-ham, predictive microbiology



## **Agradecimentos**

Este projeto de investigação representa a concretização de mais uma etapa académica na minha vida a somar a outras tantas, contudo, esta tem para mim um sabor muito especial uma vez que será a rampa de lançamento para o mundo laboral.

Por esse motivo, quero deixar o meu maior agradecimento a todos aqueles que me apoiaram ao longo deste meu percurso académico, aos meus pais que com todo o amor e carinho me apoiaram em todos os momentos, a toda família e amigos também sem eles nada disto faria sentido. Sei que compreenderam e aceitaram muitas vezes a minha indisponibilidade, por esse motivo ficarei eternamente grata pelo vosso carinho e amizade.

Um enorme agradecimento à minha orientadora, Professora Doutora Paula Teixeira e Doutora Vânia Ferreira, pela partilha de conhecimentos e estratégias que permitiram a elaboração deste meu trabalho de forma eficaz. O meu muito obrigado pela forma como me receberam e como se mostraram disponíveis para me ajudar a superar os mais diversos obstáculos que foram surgindo ao longo desta caminhada. Hoje, posso dizer que graças à vossa colaboração e empenho as minhas competências neste domínio estão muito mais enriquecidas.

A toda a equipa do laboratório de microbiologia alimentar da Escola Superior de Biotecnologia, um grande bem-haja por todo o apoio e partilha de conhecimentos. Para ti Ângela Alves, os meus melhores agradecimentos por toda a ajuda e por teres permitido que eu fosse a tua “sombriinha”, foi desta forma, que aprendi muito contigo.

Um agradecimento especial à Doutora Cristina Mena, que partilhou comigo muitos dos seus conhecimentos na área da microbiologia preditiva. Aos vários professores, funcionários e colegas da Escola Superior de Biotecnologia que se mostraram sempre disponíveis, contribuindo também para o desenvolvimento deste meu trabalho.

*“Jamais considere os seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade  
invejável para aprender o desconhecido”*

Albert Einstein



## Índice

1. Introdução .....	13
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	14
1.2 <i>Listeria</i> e Listeriose .....	19
1.3 Desenvolvimento de <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos quando expostos a temperaturas de abuso .....	23
1.4 Microbiologia Preditiva .....	26
2. Materiais & Métodos .....	31
2.1 Estirpes de <i>Listeria monocytogenes</i> e preparação do inóculo .....	31
2.2 Preparação de amostras e condições de armazenamento .....	32
2.2.1 Condição de estudo da experiência I – maio .....	33
2.2.2 Condição de estudo da experiência II – julho .....	33
2.3 Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> durante o armazenamento .....	34
2.4 Microrganismos Totais a 30 °C .....	35
2.5 Enumeração de bactérias do ácido láctico .....	35
2.6 Microbiologia Preditiva .....	36
2.6.1 ComBase .....	36
2.6.2 Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP) .....	38
3. Resultados .....	40
3.1 Experiência I – maio .....	40
3.2 Experiência II – Julho .....	42
3.3 Modelos de Microbiologia Preditiva – Combbase e FSSP .....	44
3.3.1 Combbase – maio .....	44
3.3.2 Combbase - julho .....	46
3.3.3 FSSP – maio .....	48
3.3.4 FSSP – julho .....	49
4. Discussão .....	52
5. Conclusões .....	58
6. Referências Bibliográficas .....	60

## Anexos



## 1. Introdução

A revolução industrial no século XIX permitiu o avanço do conhecimento tecnológico que por sua vez, possibilitou ao longo do século XX um crescimento sustentado face ao desconhecimento de matérias ainda pouco exploradas. Já o século XXI, também conhecido pela era da digitalização, imprime hoje de forma quase obrigatória um novo ciclo de crescimento, desta vez a um ritmo ainda mais acelerado. A procura de respostas face à enorme diversidade na oferta de um novo mundo que se diz agora cada vez mais global, torna imperativa a procura de novas estratégias para adaptação do ser humano às novas vivências, importantes também para a sustentabilidade das atuais gerações que se revelam cada vez mais, como gerações do mundo ou gerações multiculturais.

A importância da interação entre pessoas e organizações, bem como a valorização da comunicação têm possibilitado aos mais diversos *stakeholders* uma maior reflexão sobre a temática da Segurança Alimentar. Desta forma, fica assim reconhecida a necessidade de cooperação entre todos os intervenientes nesta matéria e, por conseguinte, só assim se tem alcançado melhorias significativas da qualidade de vida e conseqüentemente, da saúde pública.

O novo paradigma assenta hoje na transmissão de informação sobre práticas corretas de confeção e de armazenamento dos alimentos. As mudanças de estilo de vida que o Homem tem vindo a adquirir ao longo dos últimos anos, incitam à alteração dos hábitos de consumo. Com estas mudanças de rotina, a população em geral procura alimentos que sejam práticos para serem consumidos num curto espaço de tempo, alimentos esses que não requerem qualquer tipo de tratamento e confeção que elimine/previna a presença de microrganismos responsáveis por causar doença num indivíduo. Esse tipo de alimentos são comumente designados por *ready-to-eat food* (RTE food), ou Alimentos Prontos a Comer (Regulamento (CE) nº 2073/2005).

Sabe-se que estes tipos de alimentos estão associados a um grande número de surtos alimentares, resultando daí a necessidade de um maior controlo ao nível de segurança alimentar durante as várias fases de produção de um alimento, para que assim seja possível perceber a vulnerabilidade de cada uma destas etapas (Cartwright et al., 2013).

Assim, a Segurança Alimentar tem por objetivo garantir que um determinado produto alimentício não cause qualquer tipo de doença ao consumidor, quando consumido de acordo com o uso pretendido e em simultâneo respeitando as instruções do fornecedor mencionadas no rótulo do alimento. O conceito de Segurança Alimentar abrange de uma forma geral todos os tipos de perigos (Biológicos, Químicos ou Físicos) que podem ocorrer ao longo da cadeia alimentar, quer sejam eles ao nível da produção, transformação, distribuição, fornecimento, venda e muito importante na altura do consumo (Regulamento (CE) nº 2073/2005; *Codex Alimentarius* Commission, 2007).

Ao longo de vários anos as doenças transmitidas por alimentos têm vindo a ser uma das grandes preocupações a nível da saúde pública e a redução deste tipo de enfermidades têm sido um dos principais focos de atenção nos países desenvolvidos.

Hoje, as autoridades alimentares em conjunto com as indústrias tentam criar novas estratégias que permitam a redução do número de surtos alimentares. Esta é atualmente uma questão que passa para a ordem do dia, permitindo uma redefinição no que respeita à reeducação dos consumidores, enfatizando que pequenas alterações de hábitos pouco seguros praticados em ambiente doméstico podem melhorar a saúde da população, reduzindo o risco de doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados (Osman et al., 2019).

Estudos recentes realizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) revelaram a ocorrência de aproximadamente 23 milhões casos de doenças associados a surtos causados por microrganismos, tendo sido registado um total de 5000 mortes por ano na Europa. Dos casos notificados, cerca de 40% ocorreram em ambiente doméstico devido à violação de regras de Segurança Alimentar por parte do consumidor. Estas más práticas encontram-se essencialmente associadas ao armazenamento, confeção, conservação, manipulação e higiene pessoal ao longo de toda a cadeia (WHO, 2015).

De entre vários microrganismos, destacam-se cinco patogénicos que apresentam uma maior prevalência como agentes causadores de surtos alimentares (*Campylobacter* spp., *Salmonella* spp, norovírus, *Toxoplasma gondii* e *Listeria monocytogenes*). Destaca-se a bactéria *L. monocytogenes* responsável por uma infeção rara, a listeriose, mas que apresenta um índice elevado de mortalidade. Dados reportados pela EFSA em parceria com o ECDC, demonstram que *L. monocytogenes* é responsável por listeriose e é transmitida principalmente pelo consumo de alimentos prontos a comer (EFSA & ECDC, 2018).

Assim, os estudos desenvolvidos nos últimos anos sobre a mudança de hábitos de consumo, o modo de preparação de alimentos e a exposição a temperaturas de refrigeração inadequadas, ganhou hoje um papel preponderante no cenário da comunidade científica.

### 1.1 *Listeria monocytogenes*

A espécie *L. monocytogenes* pode ser encontrada nos mais diversos ambientes, por isso é conhecida por ser uma bactéria ubiqüitária (US Food and Drug Administration, 2004). Este tipo de microrganismo destaca-se atualmente pela importância no que respeita à saúde pública, por esse motivo a comunidade científica entende que o comprometimento da sociedade em geral revela fragilidades que podem exibir um grande impacto na economia global.

O género *Listeria* atualmente inclui 17 espécies, que demonstram diversas características fenotípicas e genotípicas. As dezassete de espécie de *Listeria* são divididos em dois grupos: *Listeria sensu stricto* (*L. monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria marthii*, *Listeria innocua*) e o grupo *Listeria sensu lato*, sendo que cinco destas foram descritas recentemente por den Bakker e a sua equipa (*Listeria grayi*, *Listeria fleischmannii*, ***Listeria floridensis***, ***Listeria aquatica***, *Listeria newyorkensis*, ***Listeria cornellensis***, *Listeria rocourtiae*, *Listeria weihenstephanensis*, ***Listeria grandensis***, ***Listeria riparia*** e *Listeria booriae*) (Scallan et al., 2011; den Bakker et al., 2014).

As bactérias pertencentes ao género *Listeria* são Gram-positivas e pertencem à família *Listeriaceae*. De entre as várias espécies mencionadas anteriormente, apenas duas são reconhecidas como sendo bactérias patogénicas, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*. No entanto, foram registados alguns casos pontuais e raros, causados por *L. welshimeri* e *L. seeligeri* (Gray & Killinger, 1966; Johnson et al., 2004; McLauchlin & Rees, 2009).

A espécie que representa uma maior preocupação é então *L. monocytogenes*, uma vez que a infeção que causa, listeriose, apesar de rara e de baixa incidência, demonstra uma elevada taxa de mortalidade. Por consequência, têm sido registados um enorme número de casos isolados e até mesmo, vários surtos alimentares causados por este microrganismo, representando assim uma constante ameaça para a saúde pública

(Churchill et al., 2019). As principais características de *L. monocytogenes* são apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1** - Características de *Listeria monocytogenes*.

<b>Características de <i>L. monocytogenes</i></b>		<b>Referências Bibliográficas</b>
Anaeróbia Facultativa		US Food and Drug Administration, 2004
Não reduz nitrato a nitrito		Weller et al., 2015 Den Bake et al., 2014 McLauchlin and Ress, 2009 Orsi & Wiedmann, 2016
Reações Positivas aos seguintes testes	Oxidase, Urease, Indol, Catalase e Voges-Proskaver, atividade hemolítica em agar de sangue.	US Food and Drug Administration, 2004 Gray & Killinger, 1996 Romick, Fleming & McFeeters, 1996 Weller et al., 2015
Mobilidade	(+) Temperaturas próximas dos 25 °C; (-) Temperaturas acima dos 25 °C	Den Bake et al., 2014 McLauchlin and Ress, 2009 Orsi & Wiedmann, 2016

Capaz de produzir	Acetil-metil-carbonol (Acetoina), Butilenoglicol, pequenas quantidades de ácido carboxílico (através da fermentação de glucose a partir da via butileno glicólica)	Romick, Fleming & McFeeters, 1996
Fermenta	2-metil D-glucosidase, D-arabinitol, Celobiose, D-frutose, D-manose, N-acetilglucosamina, maltose e lactose.	Weller et al., 2015 Den Bake et al., 2014 McLauchlin and Ress, 2009 Orsi & Wiedmann, 2016
Intervalo de temperaturas de crescimento	T (-0,4 °C a 45 °C); Tótima (20 °C a 37 °C) Nota: apresenta capacidade de permanecer durante longos períodos de tempo em alimentos congelados	US Food and Drug Administration, 2004 Le & Leclercq, 2009
Tolerância ao NaCl	Máximo 10%	
Valores de pH favoráveis ao crescimento:	pH (4,3 a 9,4); Taxa de crescimento máxima: pH (6 a 8). Nota: estes valores podem variar consoante outros fatores de crescimento	

Como já foi mencionado anteriormente, *L. monocytogenes* é um microrganismo anaeróbio facultativo. Contudo, o seu crescimento é favorecido na ausência de oxigênio, ou seja, em condições de anaerobiose. Todavia, concentrações de CO<sub>2</sub> superiores a 80% acabam por ter um efeito inibitório no seu desenvolvimento (McLauchlin et al., 2004).

Quando esta bactéria se encontra em condições de temperatura e de pH favoráveis ao seu desenvolvimento, o limite mínimo dos valores de atividade da água (a<sub>w</sub>) para ocorrer o seu crescimento é de 0,92 (US Food and Drug Administration, 2004; McLauchlin et al., 2004).

Sendo uma bactéria Gram-positiva face a outras com a mesma característica, demonstra um comportamento similar quando sujeita a tratamentos de irradiação. No entanto, apresenta uma menor resistência a radiação Ultravioleta (UV) quando comparada com outras bactérias Gram-positivas (US Food and Drug Administration, 2004; McLauchlin et al., 2004).

Outra das capacidades que este microrganismo apresenta é a produção de biofilmes, que lhe confere a vantagem de se fixar a equipamentos e superfícies e acaba por contribuir para a contaminação de alimentos e disseminação desta bactéria no ambiente. Estas comunidades biológicas estruturadas apresentam uma enorme resistência a processos de limpeza e desinfecção (Heir et al., 2018), vantagem que lhe permite a sobrevivência e manutenção, que por sua vez se assume como um enorme problema para a indústria e comércio.

De acordo com as suas características antigénicas as estirpes de *L. monocytogenes* são sub-dividida em 13 serótipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7). Torna-se importante realçar que diferentes estirpes de *L. monocytogenes* demonstram diversos níveis de virulência. 95% dos isolados provenientes de amostras clínicas ou alimentares são do serótipo 4b, 1/2a e 1/2b (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007; McLauchlin & Rees, 2009; Doumith et al., 2004; US Food and Drug Administration, 2004).

## **1.2 Listeria e Listeriose**

*Listeria monocytogenes* é responsável por causar listeriose e é um dos cinco microrganismos patogénicos responsáveis por causar um elevado número de surtos na Europa (EFSA & ECDC, 2018).

Esta infecção apresenta baixa incidência e não sendo comum este tipo de enfermidade, a maioria das ocorrências leva à hospitalização dos indivíduos que a contraem, sendo que a sua taxa de mortalidade pode variar entre 20-30% e em indivíduos suscetíveis chega mesmo a atingir valores próximos dos 75% (Rothrock et al., 2017; Tahoun et al., 2017).

Em 2018, a Organização Mundial de Saúde reportou que a incidência de listeriose é de 0,1 a 10 casos por 1 milhão de pessoas por ano, variando de país para país (WHO, 2018).

O número de casos de listeriose tem aumentado na União Europeia, sendo que em 2005 foram registados 1439 casos e passados 11 anos esse número aumentou para 2530 casos (EFSA & ECDC, 2017; EFSA & ECDC, 2016; EFSA & ECDC, 2015; EFSA & ECDC, 2010; EFSA & ECDC, 2006). De acordo com os dados reportados pela EFSA & ECDC (2017), as 247 mortes anuais correspondem a uma taxa de mortalidade próxima dos 16,2%. De acordo com a Food Standards Australia New Zealand (FSANZ), a cada ano surgem aproximadamente 150 hospitalizações associadas a listeriose, sendo que 15 desses internamentos resultam na morte do paciente. Nos Estados Unidos, foram reportados pelo CDC (Centres for Disease Control and Prevention) aproximadamente 1600 casos anuais, dos quais 16,25% resultaram na morte do indivíduo infetado pela bactéria *L. monocytogenes* (CDC, 2017; FSANZ, 2017). Assim, estes números levam a que esta doença continue a suscitar um enorme interesse dentro das várias comunidades científicas.

No entanto, torna-se importante realçar que tanto nos Estados Unidos da América (EUA), como na União Europeia (EU) o número de ocorrências registadas representa apenas uma fração do número real dos casos que ocorrem, pois, grande parte destes incidentes não chegam a ser confirmados ou até mesmo identificados como casos de listeriose (Arendt et al., 2013). Apenas surtos de grande dimensão ou que causam doenças graves, têm uma maior probabilidade de serem investigados e reportados às entidades responsáveis. Por isso, os dados existentes nem sempre correspondem à realidade (EFSA, 2007; O'Brien et al., 2002).

O processo de globalização, tem evidenciado constantes alterações de comportamentos, valores e hábitos que até então se encontravam confinados apenas a uma comunidade restrita, mas que hoje se difundem à escala mundial (Contini et al, 2016).

A partilha de costumes entre as várias comunidades espalhadas pelo mundo, o crescimento do comércio internacional, a estrutura e organização familiar no século XXI (ritmo de vida e extensão de horas de trabalho, a participação da mulher no mundo do trabalho, juventude com escassa habilidade culinária e fatores socioeconómicos), desempenham hoje um papel crucial nas escolhas e alterações dos hábitos de consumo (Contini et al., 2016).

O consumo de alimentos contaminados é a principal causa de listeriose. Esta doença não está apenas associada a uma categoria isolada de produtos alimentares, mas sim a uma ampla gama de alimentos que se encontram associados a um elevado número de surtos, característico de um mundo global.

Prova disso, são os vários estudos desenvolvidos que têm vindo a demonstrar que a listeriose se encontra associada a vários tipos de alimentos, tais como, leite e derivados, peixes e seus derivados, carnes e derivados de carne, frutas, vegetais. Os produtos designados de alimentos prontos a comer são de grande relevância (Data, Laksanalamai & Solomotis, 2013). De acordo com Callejón e a sua equipa, a grande maioria dos surtos são associado ao consumo de frutas e vegetais frescos, tanto nos Estados Unidos (EUA), como a nível da União Europeia (EU) (Callejón et al., 2015).

Segundo Ricci et al. (2016), foram encontrados produtos prontos a comer de peixe, carne e queijo com valores superiores a 100 UFC / g de *L. monocytogenes* (1,7%, 0,43% e 0,06% /g, respetivamente). Isto demonstra que *L. monocytogenes* é mais prevalente em peixes prontos a comer do que produtos carneos prontos a comer ou queijos. Dentro das categorias de queijos, os “queijos de pasta mole” e “queijos de pasta semi-mole” demonstraram um maior nível de incumprimento em relação ao “queijo de pasta dura” (a diferença é de 0,2-1,8% para 0,03%). O leite e seus derivados são aqueles com menor percentagem de inconformidades, o equivalente a 0-1,7% e 0-1% (Ricci et al., 2016).

Além das categorias de alimentos já mencionadas, vários investigadores testemunharam também, ao longo de muitos anos e em vários países, diferentes casos de listeriose associados a alimentos congelados (Di Ciccio, Meloni & Ianieri, 2015).

Outro estudo realizado no âmbito deste tema, avaliou a sobrevivência e o crescimento de *L. monocytogenes* em maçãs frescas previamente fatiadas, onde foi demonstrado ainda que as maçãs fatiadas, não suportam apenas a sobrevivência desta bactéria, como também permitem o seu crescimento, especialmente a temperaturas elevadas. Assim, o consumo desta categoria de produtos apresenta uma grande

probabilidade de expor os consumidores mais suscetíveis ao risco de doença (Conway et al., 2000).

Para além disso, os alimentos prontos a comer apresentam longos prazos de validade quando se encontram a temperaturas de refrigeração e em muitos dos casos, estes produtos não necessitam de qualquer tipo de confeção antes de serem consumidos. Assim, destacam-se pelos diversos fatores que podem influenciar a presença da bactéria *L. monocytogenes* neste tipo de produtos alimentares (Cossu et al., 2015). Apesar de não existir uma estimativa global da prevalência deste microrganismo numa categoria específica de alimentos prontos a consumir, fatores como a temperatura, atividade da água ( $a_w$ ), valor de pH e concentração de sal, são cruciais na sobrevivência desta bactéria (Locatelli et al., 2013). Assim, quando um alimento pronto a comer é introduzido num ambiente favorável ou apresenta características adequadas ao desenvolvimento desta bactéria, aumenta o risco de desenvolvimento de listeriose (Cossu et al., 2015).

Assim, ao longo dos anos foi documentado e estudado, um amplo espectro de veículos alimentares responsáveis pelos mais diversos surtos de listeriose em todo o mundo (**Tabela 3 em Anexo**).

Esta doença afeta essencialmente indivíduos que apresentem uma maior fragilidade a nível imunitário, como os indivíduos imunodeprimidos por efeitos de determinada medicação ou doença (ex.: infetados pelo vírus da imunodeficiência humana, recetores de transplante, etc), grávidas, recém-nascidos, crianças com idades inferiores aos cinco anos e ainda idosos. Indivíduos com doenças hepáticas crónicas, diabetes, cancro ou sobrecarga de ferro transfusional em portadores de anemia, são também incluídos nestes grupos de risco. Porém, existe ainda o risco ocupacional, ou seja, pessoas que trabalham com animais e silagens, como é o caso dos agricultores, veterinários e outros (Zhang et al., 2016; Zhu et al., 2017).

Como já foi mencionado anteriormente, esta bactéria encontra-se difundida pelos mais diversos ambientes e adicionalmente, o Homem e os animais podem também ser portadores assintomáticos deste microrganismo. Quando a doença é adquirida pelo contacto com animais, a listeriose pode manifestar-se na forma de infeção cutânea.

*Listeria monocytogenes* caracteriza-se ainda por ser um patogénico intracelular, ou seja, quando a bactéria infeta o hospedeiro esta pode penetrar nas células intestinais, mas também nas células do baço, fígado, cérebro, coração e ainda, a placenta da grávida/ hospedeiro. Após ocorrer a invasão celular, a bactéria permanece nos vacúolos

e posteriormente, pode migrar para outras células através de um mecanismo de motilidade celular baseada na polimerização da actina. Este microrganismo apresenta a capacidade de proliferar para diferentes células sem que seja desencadeada uma resposta do sistema imunológico do hospedeiro (McNeill et al., 2017; Carvalho et al., 2014; Prokop et al., 2017).

Este microrganismo é responsável por dois tipos de listeriose: as formas invasiva e não-invasiva. A listeriose não-invasiva surge quando a doença se manifesta em indivíduos saudáveis, causando gastroenterite febril. Os principais sintomas incluem diarreia, náuseas, vômitos, falta de apetite, dores de estômago e cabeça, bem como dores nas articulações, mas que tendem a desaparecer num período de 1 a 3 dias no máximo (Allerberger & Wagner, 2010; EFSA & ECDC, 2017; Jurkiewicz et al., 2015; McNeill et al., 2017; Orsi et al., 2016; den Bakker et al., 2014; Wagner & McLauchlin, 2008).

A listeriose invasiva, em indivíduos que apresentam fragilidades ao nível do sistema imunitário, pode manifestar-se sob a forma de septicemias ou meningoencefalites. Esta forma de listeriose pode também afetar o feto e os recém-nascidos, sendo que a infeção afeta as grávidas principalmente no terceiro trimestre de gestação. Na grávida, os sintomas confundem-se com os de uma síndrome gripal, mas podem progredir para abortamento ou parto prematuro (Disson et al., 2008).

No entanto, um dos grupos de risco que tem mostrado um agravamento dos números estimados para esta doença, são indivíduos com idades superiores a 60 anos, em particular o grupo compreendido entre os 60 e 75 anos de idade. Assim, quando analisados estes números e correlacionados com estudos desenvolvidos na área da medicina sobre a esperança de vida da população mundial, surgem novas preocupações aliadas à listeriose. O aumento da esperança média de vida, pode possibilitar em simultâneo um aumento do número de casos de listeriose no futuro. No entanto, a EFSA registou também um aumento do número de casos em mulheres com idades compreendidas entre os 25-40 anos de idade, entre o período de 2008-2015, mas acreditam que estes valores possam estar relacionados com mulheres grávidas (EFSA & ECDC, 2017).

### **1.3 Desenvolvimento de *L. monocytogenes* em alimentos quando expostos a temperaturas de abuso**

Quando se fala em alimentos com maior grau de perecibilidade, uma das principais preocupações é a exposição desses produtos a temperaturas que permitam o desenvolvimento de microrganismos patogénicos. Assim, o controlo das temperaturas de refrigeração, torna-se um dos métodos mais eficazes na prevenção ao nível de Segurança Alimentar.

A utilização de tratamentos térmicos torna-se uma das formas mais eficazes de controlo de *L. monocytogenes*. Como esta bactéria patogénica apresenta resistência a uma ampla gama de temperaturas, torna-se importante avaliar de forma cuidadosa o tipo de armazenamento e quais os alimentos prontos a comer que se encontram sujeitos à cadeia de frio, sendo esta uma das formas mais eficazes de controlar desenvolvimento deste patogénico alimentar (Iranzo et al., 2015).

*L. monocytogenes* apresenta a capacidade de crescer a 4 °C, característica essa de elevada relevância, quando se estuda o desenvolvimento deste microrganismo a temperaturas de abuso durante o armazenamento em refrigeração (Huang et al., 2017). Assim, de acordo com a FDA as temperaturas de refrigeração não devem exceder 5 °C durante as seguintes etapas: produção, transporte e venda de alimentos. Aconselha ainda, que as temperaturas dos frigoríficos dos consumidores devem apresentar valores de temperatura similares (Huang et al., 2017).

Vários estudos relataram ainda, que a exposição de um determinado produto a temperaturas inadequadas de armazenamento, são uma das três falhas mais comuns e importantes que contribuem para o desenvolvimento microbiano e por consequência, a ocorrência de surtos alimentares (Little & Gillespie, 2008).

Vários estudos têm demonstrado que as temperaturas dos frigoríficos dos consumidores traduzem valores preocupantes face à importância deste fator na prevenção da segurança dos alimentos. Isso deve-se ao facto de o consumidor ainda não estar suficientemente informado em matéria de Segurança Alimentar. Prova disso, foram os resultados registados em 2006, nos EUA onde apenas 11% dos frigoríficos domésticos possuíam termómetros de controlo de temperaturas e somente 34% desses apresentavam funcionamento à temperatura recomendada de aproximadamente 4 °C. Já na Nova Zelândia, registaram-se percentagens de 13% a 36%, na qual os frigoríficos dos consumidores mostravam valores acima de 6 °C, em vários momentos do dia (Kosa et al., 2007). Um dos grandes problemas é que o alimento contaminado pode não demonstrar qualquer tipo de alteração sensorial ou visual que permita ao consumidor

identificar e prever a presença do microrganismo e, por isso, existe um risco acrescido para a ocorrência de surtos alimentares (Huang et al., 2017).

Então, o binômio tempo/temperatura desempenha um papel de elevada relevância na garantia da qualidade e segurança dos alimentos. Comprovando-se que este fator de controlo não altera as características físico-químicas do produto, mas permite a manutenção da qualidade dos alimentos (Stahl et al., 2015).

Num estudo feito por Colás-Medà et al. (2017), quando uma amostra de fruta fatiada foi colocada no frigorífico a uma temperatura de 4 °C durante 8 dias, observou-se um crescimento de 1,6 unidades logarítmicas de *L. monocytogenes*. Quando o mesmo alimento foi exposto a temperaturas de abuso, o crescimento aumentou para cerca de 2,2 unidades logarítmicas. Huang et al. (2017), demonstraram também que quando um alimento é sujeito a flutuações de temperaturas, observa-se um ligeiro aumento no desenvolvimento de *L. monocytogenes*, ou seja, para além da exposição de alimentos a temperaturas de abuso, é necessário ter em conta o impacto das flutuações de temperatura durante os transportes, períodos de armazenamento (supermercado ou consumidor) e tempo de prateleira a que os alimentos ficam sujeitos.

Assim, o impacto da exposição a temperaturas de armazenamento incorretas desempenha um papel crucial no desenvolvimento microbiano. Outra investigação realizada por Stahl et al. (2015), mostrou também um aumento no crescimento de *L. monocytogenes* em fiambre e patê, quando colocados a temperaturas de 5 °C, 8 °C e 15 °C. Quando as amostras foram colocadas durante uma semana às temperaturas de 4 °C, 8 °C e 12 °C, observou-se um aumento de 0,75, 2,86 e 4,17 unidades logarítmicas de *L. monocytogenes* resultando em níveis finais, respetivamente de 4,44; 6,55 e 7,86 UFC/g (Stahl et al. (2015).

Estudos reforçam a ideia de que o armazenamento de vegetais prontos a comer a temperaturas abaixo de 7 °C garante o controlo do crescimento do patogénico (Sant'Ana et al., 2012).

Outro dos exemplos, foi um estudo realizado pelo Instituto Ricardo Jorge para testar o período de vida útil de fiambre de duas marcas, onde foi demonstrado que a colocação dessas amostras a uma temperatura de 12 °C, condicionou a conservação e o prazo de validade do produto. Por isso, o cumprimento das instruções fornecidas nos rótulos dos alimentos, em particular as temperaturas de refrigeração, são cruciais para garantir a qualidade e a segurança dos alimentos (Sousa et al., 2016).

Assim, torna-se importante garantir que o alimento não apresenta qualquer tipo de contaminação quando chega às mãos do consumidor, uma vez que existe uma maior probabilidade de sobrevivência e multiplicação durante o processo de armazenamento, tanto na refrigeração, mas especialmente quando é mantido à temperatura ambiente, aumentando o risco de doença. Os cuidados referidos anteriormente, são cruciais no combate ao crescimento deste microrganismo e, combinando a temperatura de armazenamento e confeção com outros fatores, como sal e baixos valores pH e de  $a_w$ , torna-se possível retardar ou até mesmo eliminar o crescimento de *L. monocytogenes* (Koutsoumanis et al., 2004).

Embora alguns consumidores estejam cientes das temperaturas corretas de armazenamento, o número de pessoas que colocam em prática essas informações é muito reduzido. Por isso, Huang (2017), refere que um dos principais pontos-chave para a melhoria dos paradigmas da Segurança Alimentar passa por consciencializar os consumidores.

Num estudo feito por Kennedy et al. (2005), 22,4% dos entrevistados sabiam qual a temperatura correta de armazenamento dos alimentos e 76,8% das pessoas que aderiram ao estudo, disseram ter um termómetro no frigorífico. No entanto, noutra estudo realizado, verificou-se que estes números variam de país para país; no Reino Unido, apenas 10% dos entrevistados sabiam a temperatura que assegura o correto armazenamento dos alimentos. Enquanto que nos Estados Unidos e Austrália, respetivamente, 54% e 32,3% conheciam as temperaturas de armazenamento corretas (Pearce, 2004).

Conclui-se assim que a partilha de informação por parte das Autoridades de Segurança Alimentar, não é suficiente para “convencer” o consumidor, surgindo a necessidade de implementar novas metodologias de consciencialização para demonstrar ao consumidor a importância do controlo das temperaturas de exposição dos alimentos, no combate ao desenvolvimento de microrganismos causadores de surtos alimentares.

#### **1.4 Microbiologia Preditiva**

A microbiologia preditiva descreve-se com sendo um ramo científico dentro da microbiologia alimentar que tem por objetivo prever o possível comportamento microbiológico em vários tipos de alimentos quando se encontram expostos a

determinadas condições de processamento e de armazenamento (Dalgaard, 2014; Baranyi et al., 2017; Authority, A. N. Z. F., 1987).

Ao longo de várias décadas, investigadores da área da microbiologia preditiva, procuram criar e melhorar uma ampla gama de modelos matemáticos. Estes modelos permitem prever e avaliar eventuais situações de risco ao nível da segurança alimentar e da qualidade microbiológica dos alimentos. Assim, a microbiologia preditiva desenvolve este tipo de modelos matemáticos baseando-se em dados que derivam de experiências reais e das suas incertezas (Akkermans et al., 2018). A utilização deste tipo de ferramentas permite otimizar os processos alimentares e fornecer assistência quando é necessária a tomada de decisões num curto espaço de tempo (Dalgaard, 2014).

Os dados experimentais são essenciais para a construção dos modelos matemáticos e cada um desses dados utilizados vai influenciar na escolha da estrutura do modelo e os valores que vão ser estimados pelos parâmetros do modelo. Para além disso, as previsões feitas pelos modelos matemáticos vão estar dependentes dos dados experimentais. Por isso, quando se criam novos modelos o importante é avaliar a qualidade e a validade dos modelos criados (Akkermans et al., 2018).

Os modelos preditivos geralmente traçam o crescimento ou inativação microbiológica de um determinado microrganismo, quando este se encontra sujeito a condições específicas do meio ambiente (ex.: armazenamento, comércio ou importação), tais como, temperatura, pH,  $a_w$ , entre outros, permitindo determinar prazos de validade para um determinado alimento, ou ainda, prever o impacto da reformulação de um produto na sua microbiota (Mejlholm and Dalgaard, 2009; 2015; Tamplin, 2017).

Segundo Tamplin (2017), o crescimento de microrganismos é tipicamente segmentado em parâmetros cinéticos, incluindo a fase de latência, a taxa de crescimento ou de inativação e a densidade populacional máxima (Tamplin, 2017).

Assim, hoje em dia a microbiologia preditiva desempenha um papel relevante nos sistemas de HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*) implementados pelas indústrias alimentares, pois permite identificar possíveis riscos de origem microbiológica e definir limites de controlo, bem como, a implementação e criação de medidas corretivas (Dalgaard, 2014). Segundo o Regulamento 2073/2005, estes modelos de microbiologia preditiva, são considerados uma ferramenta que permite documentar a segurança dos alimentos prontos a comer (TenenhausAziza & Ellouze, 2015).

Existem já vários modelos criados para este efeito. No entanto, a sua aplicação nem sempre é acessível a todos os utilizadores, a menos que estes modelos sejam incluídos em softwares intuitivos e de fácil utilização, tais como o *Food Spoilage and Safety Predictor* (FSSP), *ComBase (Combined Database for Predictive Microbiology)* e *microHidro v 1.7.7*, por exemplo (Dalgaard, 2019; Nyhan et al., 2018; Granados, Pérez & Valero, 2018).

Alguns destes softwares são disponibilizados de forma gratuita. Os modelos preditivos na área da microbiologia alimentar disponíveis na base de dados ComBase, que funcionam como uma ferramenta quantitativa, são um exemplo o principal objetivo destes modelos é prever o comportamento de um determinado microrganismo quando sujeito a diferentes condições características do alimento. Com os milhares de registos guardados nesta plataforma, torna-se possível descrever os mais diversos cenários alimentares durante a exposição a diversos fatores intrínsecos e extrínsecos que podem afetar o desenvolvimento do microrganismo, mostrando assim aos utilizadores, como as populações microbianas mudam o seu comportamento consoante o ambiente a que estão expostas através da disponibilização de milhares de curvas de crescimento e sobrevivência microbiana. Esta ferramenta permite ainda às indústrias alimentares, perceber quais as formas mais seguras de produzir e armazenar alimentos, incluindo o desenvolvimento de novos produtos e reformulação daqueles que já existem no mercado (Perez-Rodriguez & Valero, 2013; Nyhan et al., 2018).

Já o software FSSP (*Food Spoilage and Safety Predictor*) para Windows (versão 4.0) encontra-se disponível de forma gratuita para download no site da Universidade Técnica da Dinamarca (*Technical University of Denmark – DTU – <http://fssp.food.dtu.dk/>*). O FSSP foi lançado em 2014 e é uma versão melhorada do software anteriormente desenvolvido em janeiro de 1999, *Seafood Spoilage and Safety Predictor* (SSSP). Esta nova versão, foi desenvolvida para facilitar a utilização prática dos modelos matemáticos com o objetivo de prever o crescimento de microrganismos patogénicos e deteriorantes presentes em alimentos, e ainda, permitir prever o efeito das condições de armazenamento quando sujeito a temperaturas constantes ou de variáveis, durante o tempo de vida de útil do produto.

O FSSP V.4.0 disponibiliza:

- Modelos relacionados com a Taxa Relativa de Deterioração (RRS) referente a produtos específicos, bem como modelos de RRS genéricos;
- Modelos que determinam o potencial de deterioração microbiana;

- Modelo genérico para prever crescimento microbiano e prazos de validade;
- Modelos para comparar previsões do FSSP com dados do próprio utilizador, sobre o prazo de validade ou o crescimento de bactérias;
- Modelo para prever o crescimento de *Lactobacillus* spp. em frutos do mar e carnes e seus derivados;
- Modelos para prever crescimento e formação de histamina por *Morganella psychrotolerans* e *Morganella morganii*;
- Modelo de limite de crescimento para *L. monocytogenes*;
- Modelos para prever o crescimento simultâneo de *L. monocytogenes* e bactérias do ácido láctico em frutos do mar, queijo fresco e carnes e seus derivados;
- Modelo genérico extensivo para prever o crescimento de diferentes microrganismos em vários tipos de produtos alimentares, com base nos seus valores de parâmetro cardinal, exemplo disso, é o modelo da raiz quadrada de Ratkowsky, que utiliza estes parâmetros, como é o caso da temperatura máxima ou mínima de crescimento do microrganismo, de forma a prever a sua velocidade de crescimento (Perez-Rodriguez & Valero, 2013);

Assim, o programa FSSP de uma forma geral permite simular o comportamento da cadeia de frio e estimar o número de dias que o supermercado pode vender o produto, melhorar as condições da cadeia de frio; se houver alguma falha na cadeia de frio, facilmente este tipo de programa ajuda a decidir rapidamente se precisa de realizar um *recall* do produto ou se pode continuar sem comprometer a segurança e qualidade do alimento. Por fim, simula o comportamento de um novo alimento, a fim de reduzir o número de testes microbiológicos ao produto para que este novo produto chegue mais rapidamente ao mercado (Dalgaard, 2014; <http://fssp.food.dtu.dk/> - FSSP).

No entanto, neste software destaca-se o facto de ter sido desenvolvido de forma a contabilizar o desenvolvimento de *L. monocytogenes* e bactérias do ácido láctico, bem como o crescimento em paralelo destes dois microrganismos.

Este tipo de modelos matemáticos, através do recurso a bancos de dados, consegue prever o comportamento de *L. monocytogenes* num determinado alimento, uma vez que esses dados derivam de estudos previamente realizados em laboratório utilizando meios de cultura que simulam o alimento ou até mesmo utilizando matrizes alimentares (Koutsoumanis et al., 2007). Porém, alguns destes modelos de microbiologia preditiva não contemplam fatores como a microbiota intrínseca dos

alimentos, nem mesmo o possível efeito de componentes antimicrobianos naturais/artificiais presentes num determinado alimento (Koutsoumanis et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento de *L. monocytogenes* de diferentes origens e serotipos, após exposição a diferentes temperaturas de abuso, através da contaminação artificial de fatias de fiambre de porco, durante um período de armazenamento de 7 dias. Foi ainda objetivo de estudo comparar o desenvolvimento de *L. monocytogenes* previsto pelos softwares de microbiologia ComBase e FSSP com os resultados obtidos laboratorialmente.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Estirpes de *Listeria monocytogenes* e preparação do inóculo

Para este estudo, foram selecionada sete estirpes de *L. monocytogenes* depositadas na coleção de culturas de *Listeria* da Escola Superior de Biotecnologia (Tabela 1).

**Table 1** - Estirpes de *Listeria monocytogenes* selecionadas para neste estudo

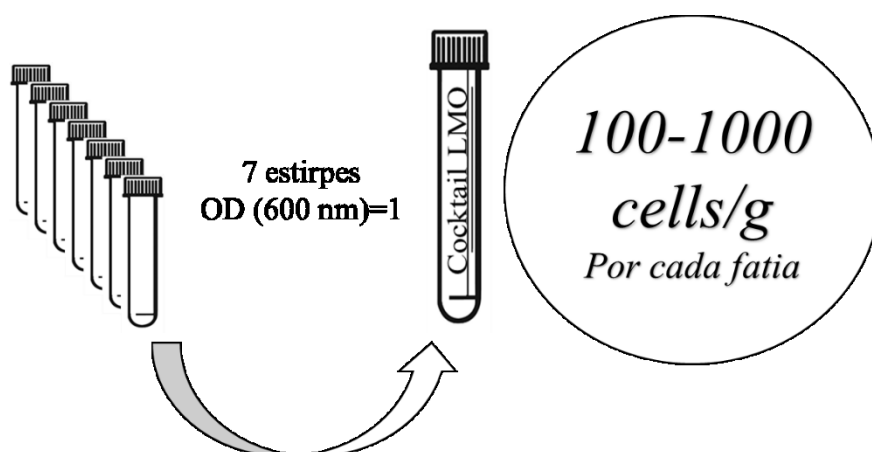
Código do isolado	Origem	Amostra	Serótipo	Ano de isolamento	Origem geográfica do isolado	Referência
Lm 2542	Humana	Placenta	4b	2010	Portugal	Magalhães et al. (2015)
FSL J1-177	Humana	ND	1/2b	1997	US	De Jesus and Whiting (2003)
FSL J1-031	Humana	Blood	4 <sup>a</sup>	1991	Canada	De Jesus and Whiting (2003)
FSL N3-013	Alimentar	Pate	4b	1988-99	UK	Bille and Rocourt (1996)
FSL R2-499	Humana	ND	1/2 <sup>a</sup>	2000	US	CDC (2000)
FSL N1-227	Alimentar	ND	4b	1988-99	US	CDC (1998)
MF4077	Alimentar -associada ao meio ambiente	ND	1/2 <sup>a</sup>	ND	Noruega	Møretrø et al. (2017)

ND = Não definido

As culturas *stock* foram mantidas a -80 °C em Tryptic Soya Broth com 0,6% (p/v) de extrato de levedura (TSBYE, LABM, Bury, Reino Unido) e suplementado com 30% (v/v) de glicerol. Antes de cada utilização, as culturas foram repicadas de forma asséptica para placas de Brain Heart Infusion agar (BHI, Biokar Diagnostic, Beauvais, França) e incubadas durante 24 h a 37 °C. Após este procedimento, transferiu-se uma

colônia de cada estirpe para 9 ml de solução de Ringer estéril (R/4, Laboratório M) e a densidade ótica (600 nm) da suspensão foi ajustada para valores próximos de 1. De seguida foi preparado um cocktail, contendo 1 ml de cada uma das suspensões de cada estirpe de *L. monocytogenes* e com auxílio do vortex a suspensão foi homogeneizada.

Posteriormente, foram realizadas diluições decimais seriadas com o intuito de obter um inóculo inicial com uma densidade celular próxima de  $10^6$  UFC/ml. As estirpes foram diluídas e combinadas em volumes iguais com níveis de aproximadamente  $10^5$  UFC/ml.



Assim, para confirmar o mesmo nível inicial de células, as suspensões celulares de cada estirpe foram diluídas e plaqueadas em BHI agar através do método da gota (incubadas 24 h a 37 °C).

## 2.2 Preparação de amostras e condições de armazenamento

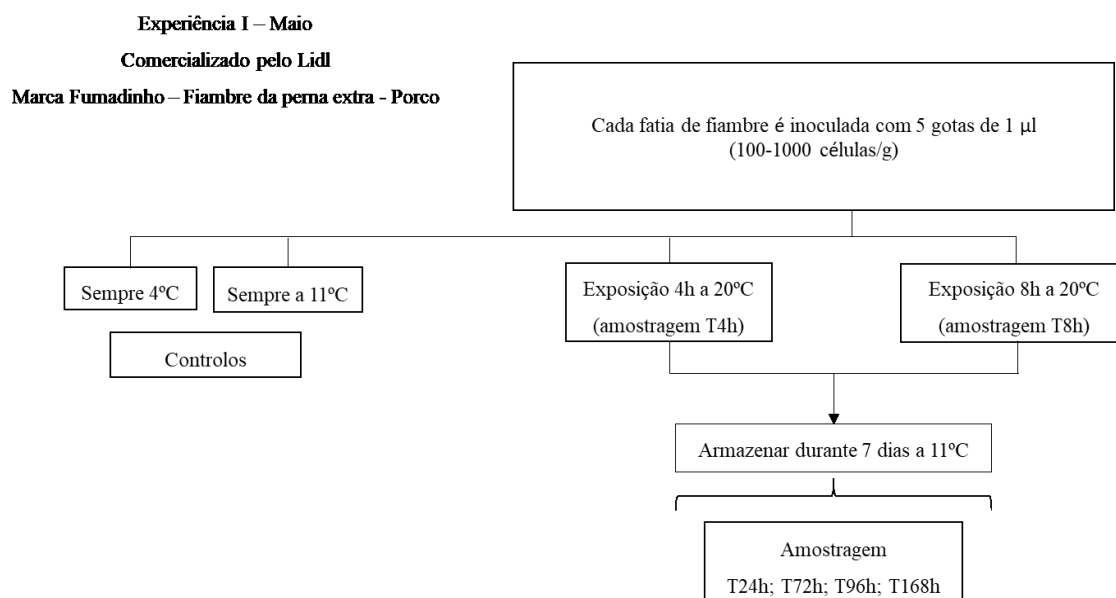
Realizaram-se duas experiências em tempos diferentes (maio e julho), onde foram utilizadas amostras de fiambre de porco pré-embalado de duas marcas diferentes e adquiridas em supermercados diferentes. Durante a experiência que decorreu no mês de maio, foi utilizado fiambre comercializado no supermercado Lidl da marca Fumadinho (Fiambre de porco da perna extra - finíssimo. Na experiência realizada no mês de julho, utilizou-se fiambre da marca Pingo Doce (Fiambre de porco da perna extra).

Após compra, o fiambre era transportado de imediato para o laboratório num saco térmico, e armazenado 4 ° C até ao momento da sua utilização. As experiências foram realizadas sempre no dia da compra, sendo que em maio foram utilizados da mesma marca dois lotes distintos (utilizados em ensaios independentes), assim como em

julho de uma outra marca foram também utilizados dois lotes diferentes e tratados de igual modo. Para todas as embalagens foi garantido aproximadamente um mês de validade após inoculação.

Cada fatia de fiambre foi inoculada em condições assépticas com 5 gotas de 1  $\mu$ l distribuídas uniformemente por em cada fatia. A quantidade de inóculo foi calculada, de forma a obter aproximadamente o valor de 100-1000 UFC/g na superfície de cada fatia. Após inoculação, as fatias de fiambre eram dobradas a meio e transferidas separadamente para sacos de stomacker estéreis e incubadas em diferentes condições de temperatura de abuso.

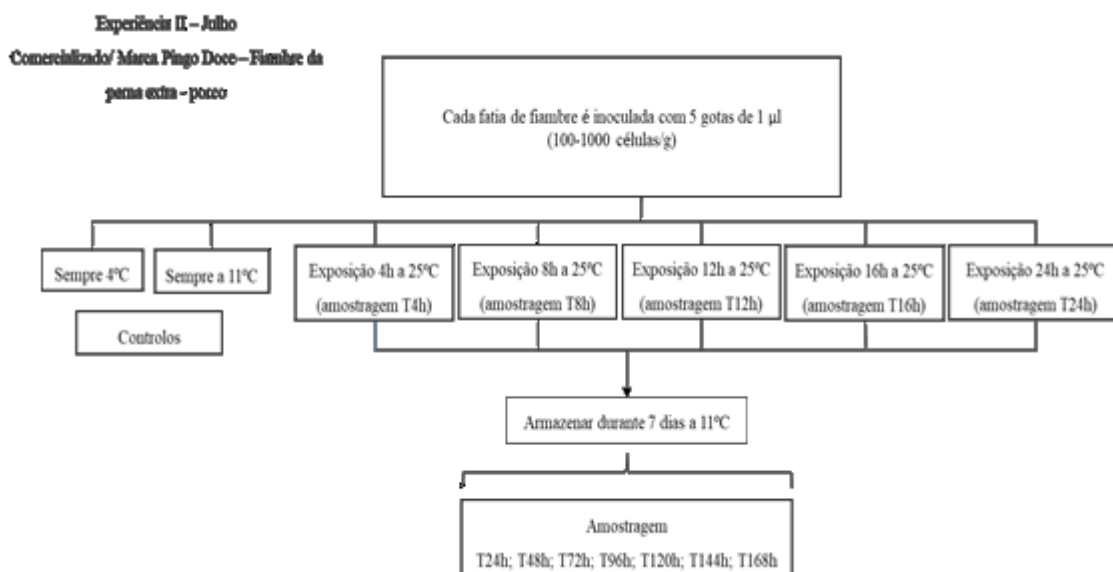
### 2.2.1 Condições de estudo da experiência I – maio



**Figura 1** – Esquema do procedimento experimental realizado durante os ensaios de maio.

Após a inoculação as fatias foram submetidas a 3 condições de temperatura de abuso: (A) incubada imediatamente a 11 ° C; (B) Incubada 4 h a 20 ° C e transferida de seguida para 11 ° C; (C) Incubada 8 h a 20 ° C e armazenada da mesma forma a 11 ° C. Nas mesmas condições de estudo, foram também armazenadas fatias não inoculadas (Fig. 1).

### 2.2.2 Condições de estudo da experiência II – julho



**Figura 2** – Esquema do procedimento experimental realizado durante os ensaios de julho.

Durante a segunda experiência (Fig. 2), o produto foi submetido a processos de oscilações de temperatura. À semelhança da primeira experiência, foram também colocadas fatias a temperaturas constantes de 4 ° C e 11° C, referenciadas como controlo. Contudo, o enfoque deste estudo recaiu sobre a exposição do produto a flutuações de temperatura, que simularam condições a que o produto é sujeito desde o ato da compra até ao seu armazenamento num frigorífico de um qualquer consumidor.

Todas as fatias foram inoculadas pelo processo referido na alínea 2.2 e passaram pela simulação de exposição durante 1 h a 20 °C (simulação de tempo no estabelecimento comercial) e ainda 30 minutos a 30 °C (tempo estimado para o transporte até casa do consumidor). Finalmente, à semelhança do primeiro estudo as fatias foram ainda armazenadas a diferentes condições de tempo e temperatura: (A) 4 h a 25 ° C; (B) 8 h a 25 ° C; (C) 12 h a 25 ° C; (D) 16 h a 25 ° C; (E) 24 h a 25 ° C. Após a exposição a cada uma destas condições, as amostras foram transferidas de imediato para uma temperatura de 11 ° C durante um período de 7 dias.

### 2.3 Enumeração de *L. monocytogenes* durante o armazenamento

Na primeira experiência, a população de *L. monocytogenes* em cada fatia foi enumerada imediatamente após o processo de inoculação e após 24 h, 48 h, 96 h e 168 h

de armazenamento. Já na segunda experiência, a sua enumeração foi diária ao longo de sete dias.

Foi também realizada enumeração de *L. monocytogene* nas amostras referentes a cada condição de abuso, ou seja, na primeira experiência realizou-se a enumeração do patogênico nas amostras mantidas 4 h e 8 h a 20 °C antes de serem transferidas para 11 °C, e o mesmo aconteceu na segunda experiência com as condições 4 h, 8 h, 12 h, 16 h e 24 h a 25 °C, também antes de serem armazenadas a 11 °C. Para cada condição, eram analisadas duas fatias de fiambre.

Para se realizar o processo de enumeração, as fatias eram pesadas e diluídas em água peptonada (BPW, Biokar) numa proporção de 1:10. Em seguida, as amostras eram homogeneizadas em *stomacher* (Bagmixer, Interscience, França) durante 60 segundos. O passo seguinte passava por retirar 1 ml de desta suspensão e proceder a diluições seriadas em solução de ringer. A enumeração foi realizada pelo método de espalhamento em meio seletivo para *Listeria* de acordo com Ottaviani e Agosti (ALOA, bioMérieux, Linda-a-velha, Portugal). De forma aumentar o limite de detecção, foi plaqueado 1 ml da diluição mais baixa em duas placas de petri (0.5 ml/placa). As placas eram incubadas a 37 °C durante 48 h e as colónias características eram contadas e expressas em Log UFC/g.

## **2.4 Enumeração de Bactérias do Ácido Lático**

Em determinados pontos de amostragem, foram enumeradas as bactérias do ácido láctico por incorporação em meio de Man, Rogosa & Sharpe Agar (MRS, BioKar) e incubação a 30 °C durante 72 h. Nos mesmos pontos de amostragem de cada experiência, as fatias não inoculadas foram utilizadas para determinar o valor de pH usando o Crison MicropH 2002 pH-meter (Crison, Barcelona, Spain), equipado com espectro de perfuração InLab 427 (Mettler Toledo, Columbus, OH), e de atividade da água usando o equipamento AquaLab PRE (Microanalítica Argentina s.r.l., AquaLab) com uma gama de medição entre os 0 e 1. Para ambos os parâmetros foram realizadas três medições de cada amostra.

Após concretizar-se a experiência laboratorial, realizaram-se as curvas de crescimentos para cada uma das experiências e condições de estudo.

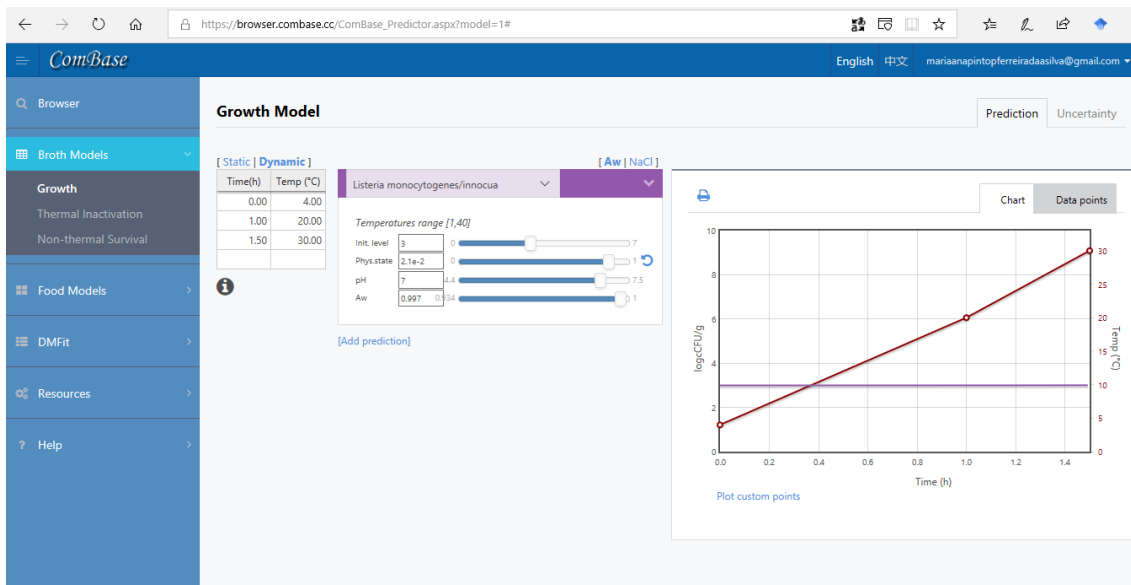
## 2.5 Microbiologia preditiva

O comportamento de *L. monocytogenes* na matriz em estudo e nas condições avaliadas laboratorialmente foi previsto utilizando os softwares de microbiologia preditiva ComBase Predictor (*Combined Database for Predictive Microbiology*, University of Tasmania and the USDA Agricultural Research Service (USDA-ARS)) e FSSP (*Food Spoilage and Safety Predictor*, Technical University of Denmark - DTU). Os resultados experimentais foram comparados com os valores gerados por estes modelos.

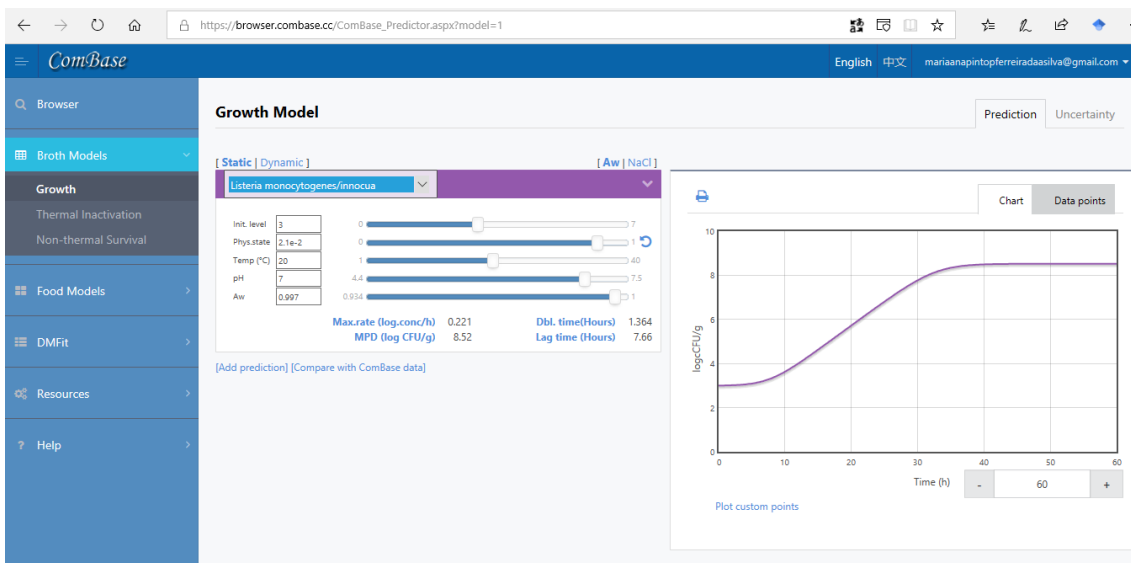
### 2.5.1 ComBase

A base de dados ComBase, apresenta modelos de crescimento dinâmicos (Fig. 3) e estáticos (Fig. 4). A diferença entre estas duas tipologias, está apenas na variação de temperatura ao longo do tempo. Estes dois modelos não contabilizam as variações de pH,  $a_w$ , nem mesmo a presença de uma microbiota indígena, tal como é o caso das bactérias do ácido láctico que influenciam o crescimento de *L. monocytogenes*.

Para tentar colmatar esta limitação do modelo, foram feitas previsões em intervalos de 24 h no modelo estático utilizando como valores iniciais de pH e de  $a_w$  obtidos na leitura real (em laboratório). Para além disso, era utilizado o último valor do número de células estimado anteriormente pelo modelo, como valor inicial da nova previsão. Posteriormente, os dados obtidos no modelo foram transferidos para um ficheiro Excel de forma a realizar a montagem do gráfico final e assim, conseguir visualizar a previsão obtida pelo modelo ComBase.



**Fig. 3** – Modelo ComBase, modelo de crescimento dinâmico.



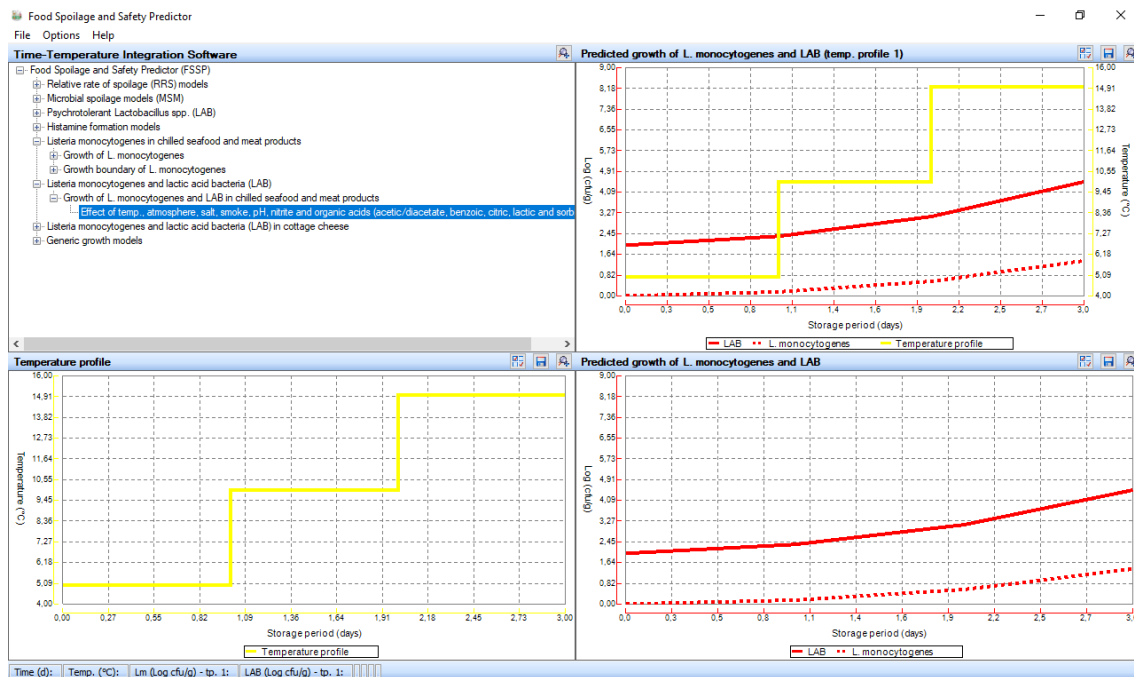
**Fig. 4** – Modelo ComBase, modelo de crescimento estático.

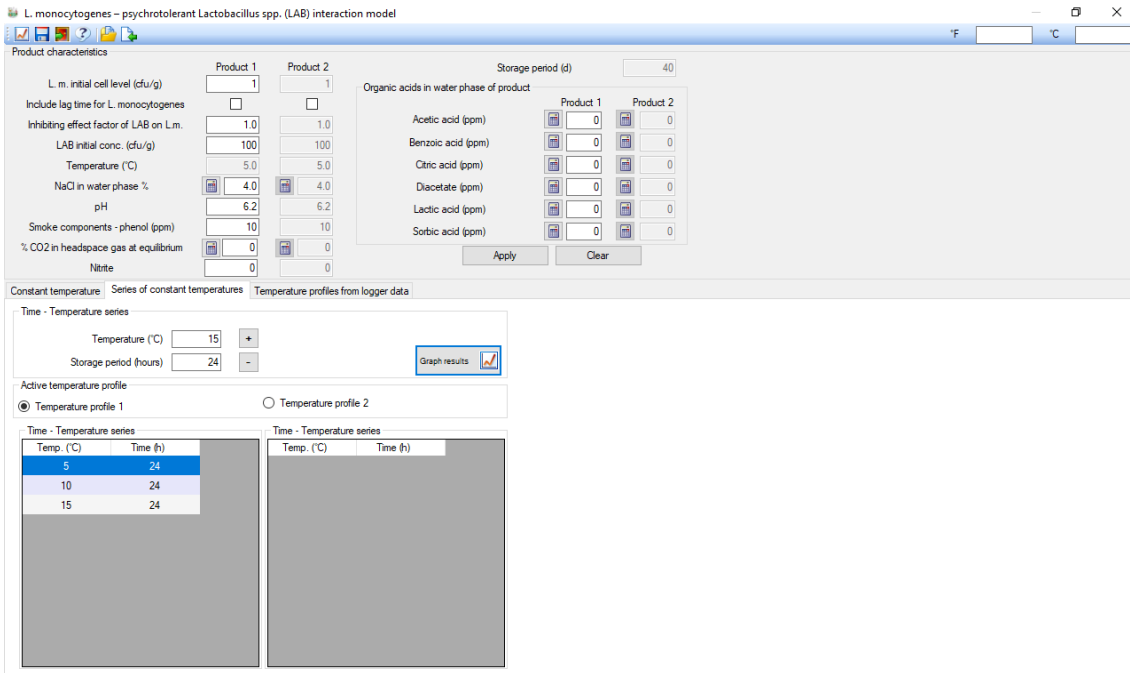
## 2.5.2 FSSP

No modelo preditivo FSSP (Fig. 5), foram também utilizados os valores do número de células iniciais obtidos em laboratório, bem como os valores iniciais de pH de cada ensaio e ainda os valores de  $a_w$  iniciais que tiveram que ser convertidos em valores de percentagem de  $a_w$  (%  $a_w$ ). Para isso, foi utilizada a seguinte fórmula (<http://fssp.food.dtu.dk/Help/Water-activity/Aw.htm>) a baixo mencionada, onde se substitui a incógnita ( $a_w$ ) pelos valores existentes.

$$\% WPS = 8 - 140.07 \cdot (a_w - 0.95) - 405.12 \cdot (a_w - 0.95)^2$$

Neste modelo, foi ainda necessário a utilização dos valores iniciais das bactérias do ácido láctico. Porém, os valores reais desta primeira experiência eram ligeiramente superiores ao que era permitido inserir no modelo. Por isso, foi inserido o limite máximo que o modelo permitiu que era um valor igual a  $10^6$  UFC/g.





**Fig. 5** – FSSP (*Food Spoilage and Safety Predictor*) – Modelo de crescimento de *L. monocytogenes* e bactérias do ácido láctico em frutos do mar refrigerados e produtos à base de carne (efeito da temperatura, atmosfera, sal, processos de fumagem, pH, presença de nitratos, ácidos orgânicos).

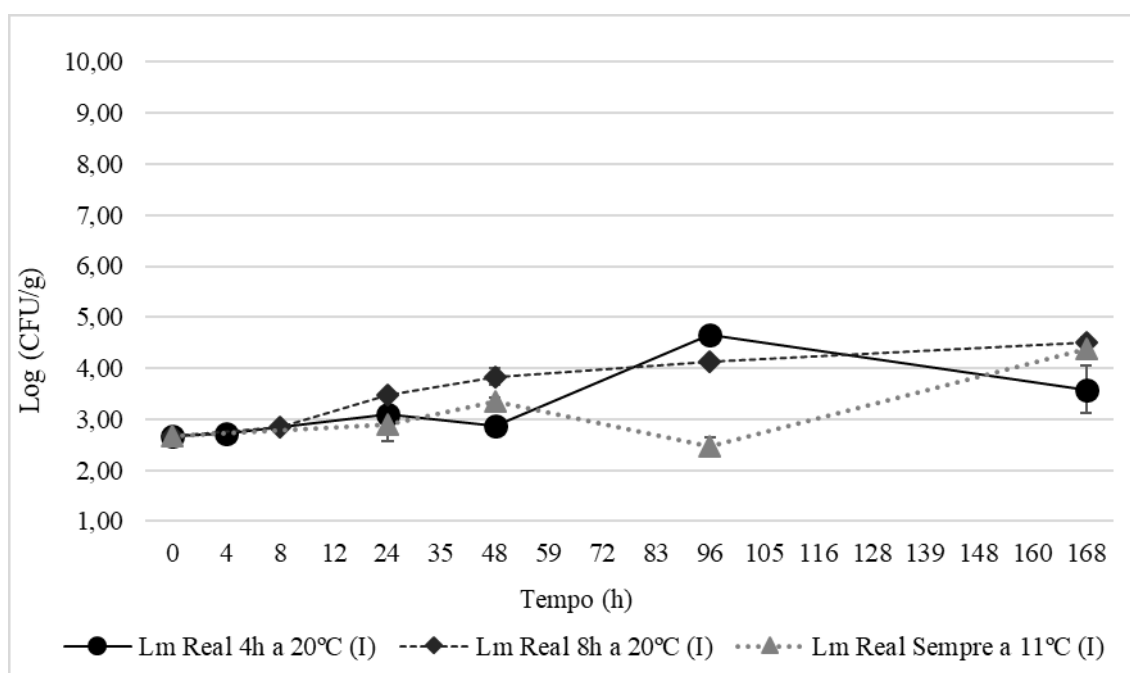
### 3. Resultados

Os resultados a seguir representados, derivam de duas experiências realizadas em laboratório durante o mês de maio e julho em que cada um deles é representado por dois ensaios independentes, com diferentes marcas e lotes de fiambre de porco, bem como diferentes estudos de abuso de temperatura.

Em paralelo, foram ainda utilizados dois tipos de softwares de microbiologia preditiva para estimar o comportamento de *L. monocytogenes* nas diferentes condições de estudo de forma a realizar a comparação entre os resultados obtidos em laboratório com os previstos pelos modelos de microbiologia preditiva.

#### 3.1. Experiência I – maio

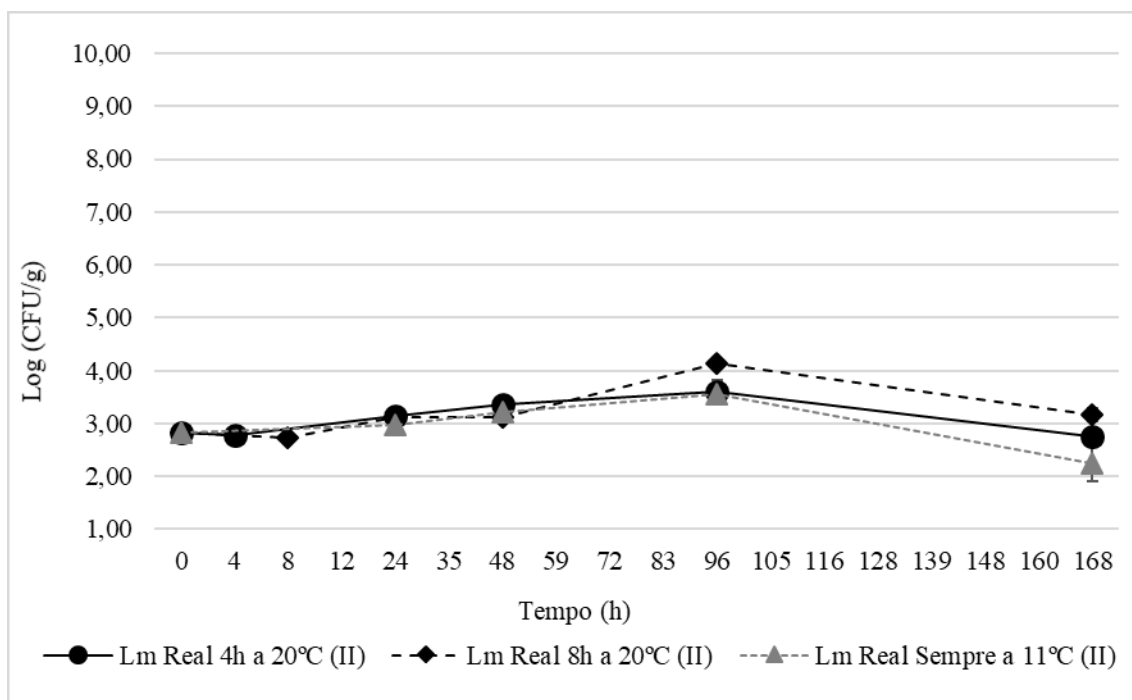
Partindo para a análise dos gráficos resultantes da experiência realizada em maio, é possível observar o comportamento *L. monocytogenes* quando exposta a condições de abuso (**Lm Real 4 h a 20 °C** e **Lm Real 8 h a 20 °C**) anteriores a uma exposição a 11 °C durante um período de sete dias.



**Gráfico 1** – Representação gráfica dos valores reais obtidos na experiência I, ensaio 1 – Condições de estudo: exposição a 20 °C durante 4 h seguida de armazenamento a 11 °C

(Lm Real 4 h a 20 °C (I)); exposição a 20 °C durante 8 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm Real 8 h a 20 °C) (I) e armazenamento a 11 °C (Lm Real Sempre a 11 °C) (I).

Na análise do **gráfico 1**, observa-se um crescimento contínuo na condição **Lm Real 8 h a 20 °C (I)** ao longo dos 7 dias de estudo, chegando a alcançar no final um valor de aproximadamente 4,50 log (UFC/g). Em contrapartida, a condição **Lm Real 4 h a 20 °C (I)** não demonstrou tanta estabilidade no crescimento ao longo dos dias, observando-se ao fim de 96 h um aumento de aproximadamente duas unidades logarítmicas. No entanto, ao fim de 7 dias de estudo, verifica-se um decréscimo de 1 valor logarítmico face ao valor atingido no ponto de leitura equivalente ao 4º dia. Já na condição **Lm Real sempre a 11 °C (I)**, observa-se um comportamento contrário à condição **Lm Real 4h a 20 °C (I)**, ou seja, verifica-se um decréscimo abaixo do valor inicial, mas que ao fim de 7 dias atinge valores iguais à condição 8 h a 25 °C, aumentando aproximadamente duas unidades logarítmicas.



**Gráfico 2** – Representação gráfica dos valores reais obtidos na experiência I, ensaio 2 – Condições de estudo: exposição a 20 °C durante 4 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm Real 4 h a 20 °C (I)); exposição a 20 °C durante 8 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm Real 8 h a 20 °C) (II) e armazenamento a 11 °C (Lm Real Sempre a 11 °C) (II).

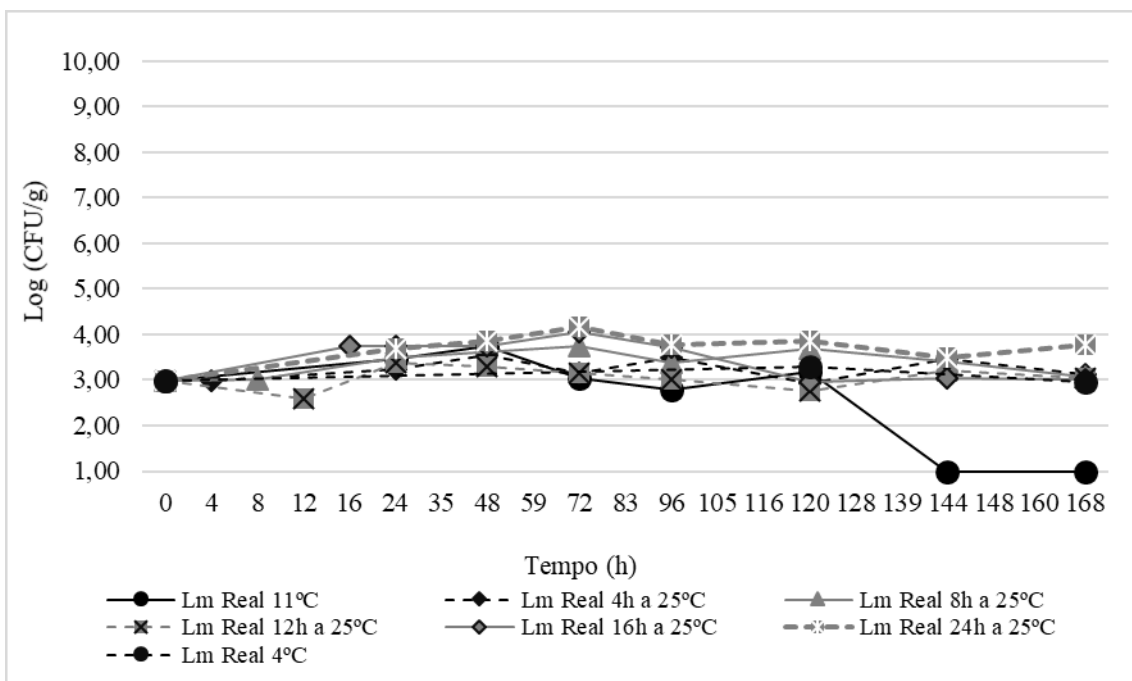
Quando comparado com o **gráfico 1**, observa-se um crescimento regular e similar entre as várias condições de estudo no **gráfico 2**. Para todas as condições foi observado um aumento próximo de uma unidade logarítmica ao fim de quatro dias (96h). No entanto, ao fim de sete dias de armazenamento verificou-se um decréscimo acentuado de *L. monocytogenes*, chegando a atingir valores inferiores aos registados no início da experiência na condição **Lm Real Sempre a 11 °C (II)**.

### 3.2. Experiência II – julho

Foi ainda realizada, uma 2ª experiência durante o mês de julho com o objetivo de estudar a exposição de *L. monocytogenes* a oscilações de temperatura, tendo sido para isso utilizado fiambre de porco de uma nova marca.

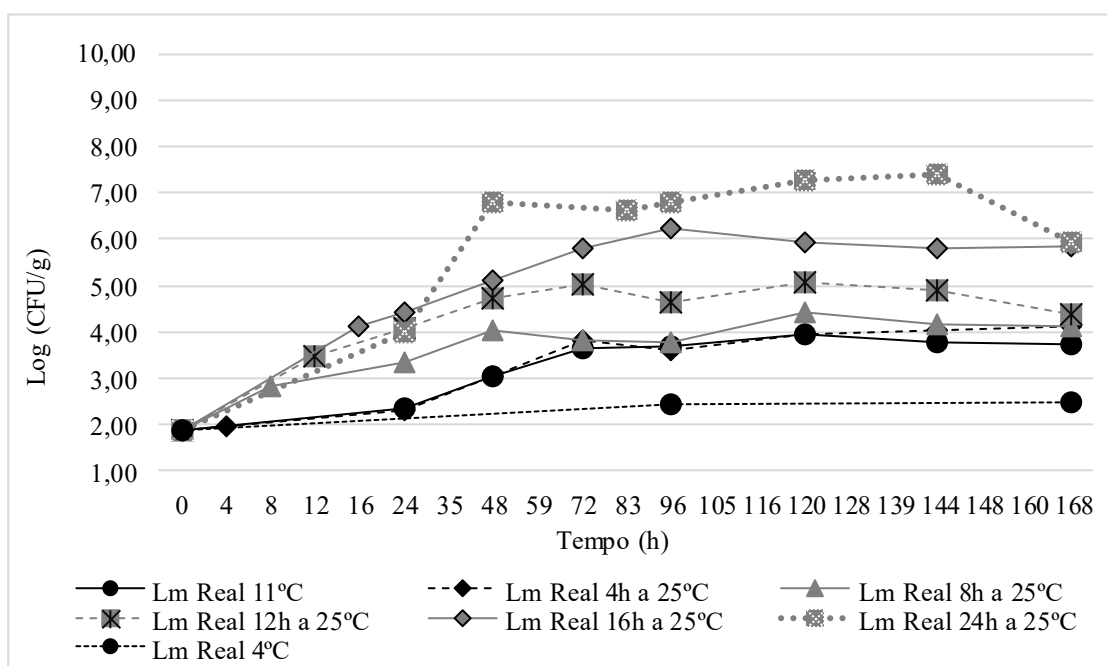
No entanto, utilizaram-se os mesmo procedimentos da experiência realizada em maio. Durante este estudo, foi também realizado em paralelo a contagem de bactérias do ácido láctico e a medição dos valores de pH e de  $a_w$ .

Como houve um maior número de condições em estudo nesta 2ª experiência, optou-se por uma configuração gráfica ligeiramente diferente em comparação com a experiência realizada em maio.



**Gráfico 3** – Representação gráfica dos valores reais obtidos na experiência II, ensaio 1 – Condições de estudo: exposição a 25 °C durante 4 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm Real 4 h a 25 °C (I)); exposição a 25 °C durante 8 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm Real 8 h a 25 °C (I)); exposição a 25 °C durante 12 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm Real 12 h a 25 °C); exposição a 25 °C durante 16 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm Real 16 h a 25 °C); exposição a 25 °C durante 24 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm Real 24 h a 25 °C) e armazenamento a 11 °C (Lm Real 11 °C)

No primeiro ensaio (**gráfico 3**), observam-se oscilações ao longo do tempo. Ao fim de sete dias de estudo, para todas as condições, com exceção da condição **Lm Real 11 °C** e **Lm Real 24 h a 25 °C**, não se detetaram alterações face ao valor inicial de inoculação. No entanto, ao fim de cinco dias de estudo na condição **Lm Real 11 °C** observou-se um decréscimo acentuado, chegando a ocorrer a morte da bactéria.



**Gráfico 4** – Representação gráfica dos valores reais obtidos na experiência II, ensaio 2 – Condições de estudo: exposição a 25 °C durante 4 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm Real 4 h a 25 °C (I)); exposição a 25 °C durante 8 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm Real 8 h a 25 °C (I)); exposição a 25 °C durante 12 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm Real 12 h a 25 °C); exposição a 25 °C durante 16 h seguida

de armazenamento a 11 °C (Lm Real 16 h a 25 °C); exposição a 25 °C durante 24 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm Real 24 h a 25 °C) e armazenamento a 11 °C (Lm Real Sempre a 11 °C).

Durante o segundo ensaio da 2ª experiência (**gráfico 4**), observa-se algo totalmente diferente quando comparado como o primeiro ensaio (**gráfico 3**). Existe agora uma tendência similar no desenvolvimento da *L. monocytogenes* nas várias condições de estudo, ou seja, as condições **Lm Real 4 h a 25 °C**, **Lm Real 8 h a 25 °C** e **Lm Real 12 h a 25 °C** demonstraram um aumento de aproximadamente 2 unidades logarítmicas. Enquanto que para as condições **Lm Real 16 h a 25 °C** e **Lm Real 24h a 25°C**, ao fim de 4 dias de estudo verifica-se um aumento próximo de 4 unidades logarítmicas. Para a condição **Lm Real 24 h a 25 °C**, atingem-se valores acima dos 7 log UFC/g. Porém, no final do estudo estes valores acabam por reduzir uma unidade logarítmica, atingindo valores similares aos observados na condição **Lm real 16 h a 25 °C**.

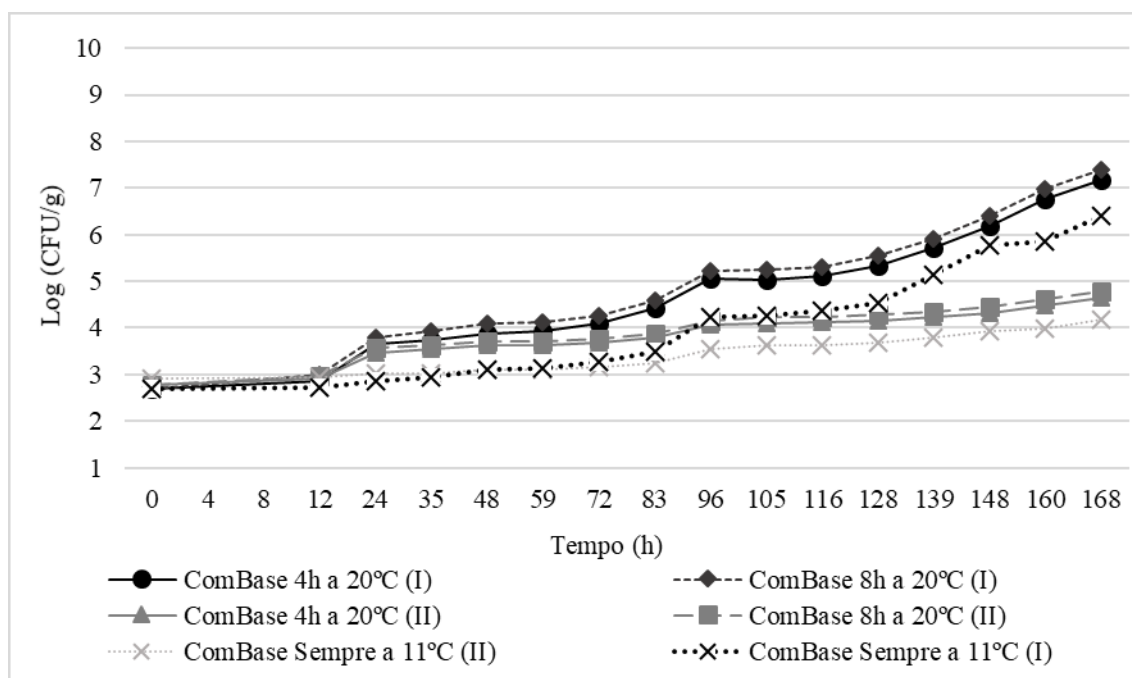
Neste segundo ensaio, observaram-se algumas diferenças quando o produto foi sujeito a uma temperatura constante de 4 °C ou quando foi exposto a temperaturas de abuso durante longos períodos de tempo. O patogénico que é sujeito a uma temperatura constante de 4 °C mantém os níveis ao longo do período de estudo. Enquanto que nas restantes condições de estudo sujeitas a temperaturas de abuso, verificou-se um crescimento proporcional face ao abuso de temperatura a que foram sujeitos ao longo do período experimental estabelecido. Não foram observadas diferenças significativas para as condições **Lm Real 11 °C**, **Lm Real 4 h a 25 °C** e **Lm Real 8 h a 25 °C**. As condições **Lm Real 12 h a 25 °C**, **Lm Real 16 h a 25 °C** e **Lm Real 24 h a 25 °C** foram as condições que resultaram em maiores variações durante o estudo.

### **3.3. Modelos Microbiologia Preditiva – Combase e FSSP**

Para o estudo dos modelos preditivos foram utilizados os valores iniciais de inoculação de *L. monocytogenes* e ainda, os valores obtidos de pH,  $a_w$  (ComBase – *Combined Database for Predictive Microbiology*; FSSP – *Food Spoilage and Safety Predictor*) e níveis de bactérias do ácido láctico.

#### **3.3.1. ComBase - maio**

Para reduzir o número de representações gráficas, optou-se pela junção dos valores gerados pelo modelo ComBase de ambos os ensaios realizados em maio (**Gráfico 5**).



**Gráfico 5** – Representação gráfica dos valores obtidos no modelo de microbiologia preditiva – Combase – referentes à 1ª experiência, ensaio 1 (I\*) e 2 (II\*) – Condições de estudo: exposição a 20 °C durante 4 h seguida de armazenamento a 11 °C (ComBase 4h a 20 °C (I e II)); exposição a 20 °C durante 4 h seguida de armazenamento a 11 °C (ComBase 8 h a 20 °C (I e II)) e armazenamento a 11 °C (ComBase Sempre a 11°C (I e II)).

Na previsão gerada pelo modelo ComBase, é possível observar um aumento exponencial ao longo do tempo em ambos os ensaios e condições, sendo importante realçar que o valor inicial era similar para ambos os ensaios. No entanto, verifica-se que o crescimento foi superior no **ensaio 1** em comparação com o **ensaio 2**.

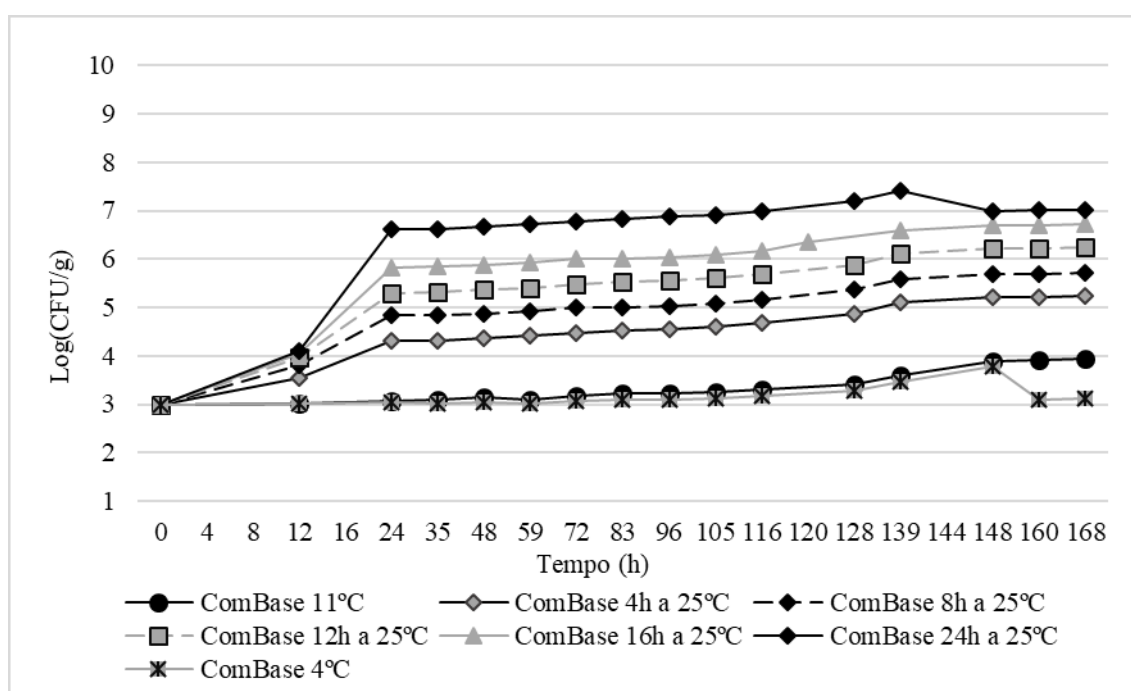
Em ambos os ensaios, verifica-se uma tendência para que as condições com maior período de exposição a temperaturas de abuso apresentem um aumento superior face as condições com menor período de exposição, ou seja, a condição **ComBase 8 h a 20 °C** demonstra que a bactéria apresenta uma maior facilidade de desenvolvimento

face a bactéria que foi sujeita à condição **ComBase 4 h a 20 °C**, ou ainda menor quando exposta a uma temperatura constante ao longo do tempo de 11°C.

Durante o 1º ensaio, observa-se um crescimento de aproximadamente quatro unidades logarítmicas nas duas condições de abuso, enquanto que a condição **ComBase Sempre a 11 °C**, verifica-se apenas um aumento de três unidades logarítmicas. No entanto, no 2º ensaio regista-se um aumento de aproximadamente uma unidade logarítmica para as condições de exposição a temperaturas de abuso e ½ valor logarítmico na condição **ComBase Sempre a 11 °C**.

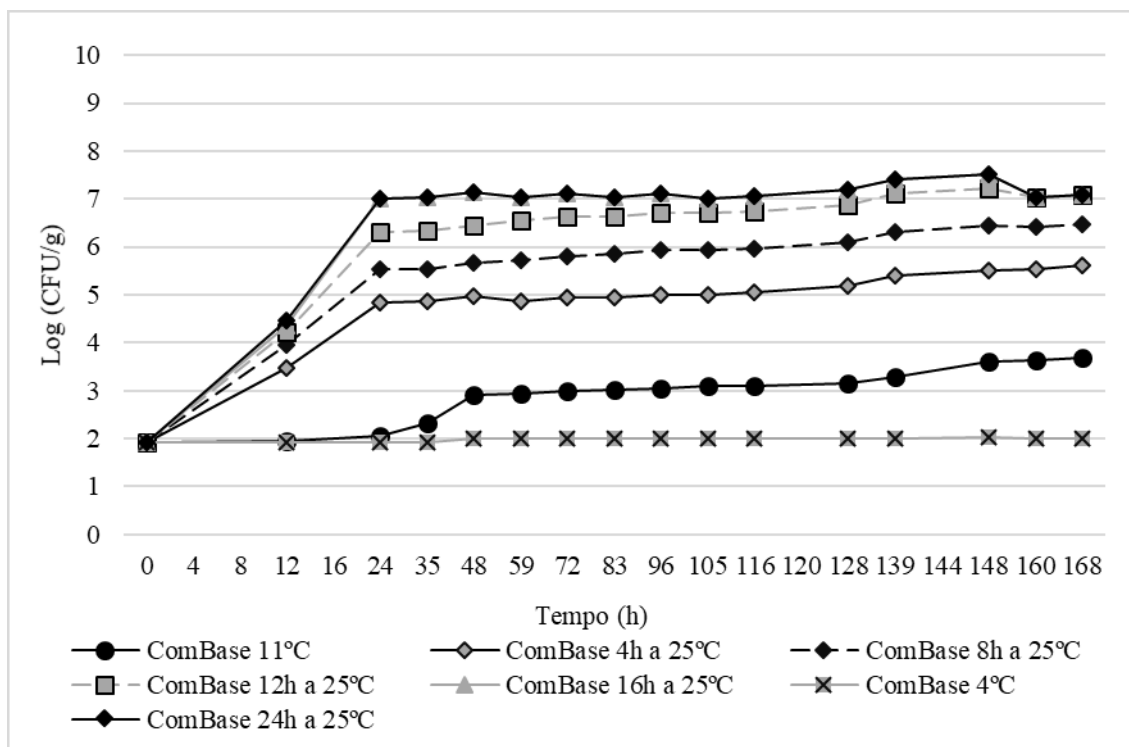
### 3.3.2. ComBase - julho

Nos **gráficos 6 e 7** (ensaio 1 e 2, respetivamente), encontram-se representados os resultados que derivaram da previsão do modelo ComBase, referentes à 2ª experiência realizada em julho.



**Gráfico 6** – Representação gráfica dos valores obtidos no modelo de microbiologia preditiva – ComBase - na experiência II, ensaio 1 – Condições de estudo: exposição a 25 °C durante 4 h seguida de armazenamento a 11 °C (ComBase 4 h a 25 °C); exposição a 25 °C durante 8 h seguida de armazenamento a 11 °C (Combase 8 h a 25 °C); exposição a 25 °C durante 12 h seguida de armazenamento a 11 °C (ComBase 12 h a 25 °C); exposição a 25 °C durante 16 h seguida de armazenamento a 11 °C (ComBase 16 h

a 25 °C); exposição a 25 °C durante 24 h seguida de armazenamento a 11 °C (ComBase 24 h a 25 °C); armazenamento a 4 °C (ComBase 4 °C) e armazenamento a 11 °C (ComBase 11 °C).



**Gráfico 7** – Representação gráfica dos valores obtidos no modelo de microbiologia preditiva – ComBase - na experiência II, ensaio 2 – Condições de estudo: exposição a 25 °C durante 4 h seguida de armazenamento a 11 °C (ComBase 4 h a 25 °C); exposição a 25 °C durante 8 h seguida de armazenamento a 11 °C (Combase 8 h a 25 °C); exposição a 25 °C durante 12 h seguida de armazenamento a 11 °C (ComBase 12 h a 25 °C); exposição a 25 °C durante 16 h seguida de armazenamento a 11 °C (ComBase 16 h a 25 °C); exposição a 25 °C durante 24 h seguida de armazenamento a 11 °C (ComBase 24h a 25 °C); armazenamento a 4 °C (ComBase 4 °C) e armazenamento a 11 °C (Combase 11 °C).

Analisando os **gráficos 6 e 7**, verifica-se que o modelo prevê um comportamento do patogénico similar para ambas as situações em estudo, não se registando diferenças significativas.

Porém, o modelo demonstra que existem diferenças notórias quando a bactéria fica sujeita a oscilações de temperatura ao longo de um período de tempo ou se for

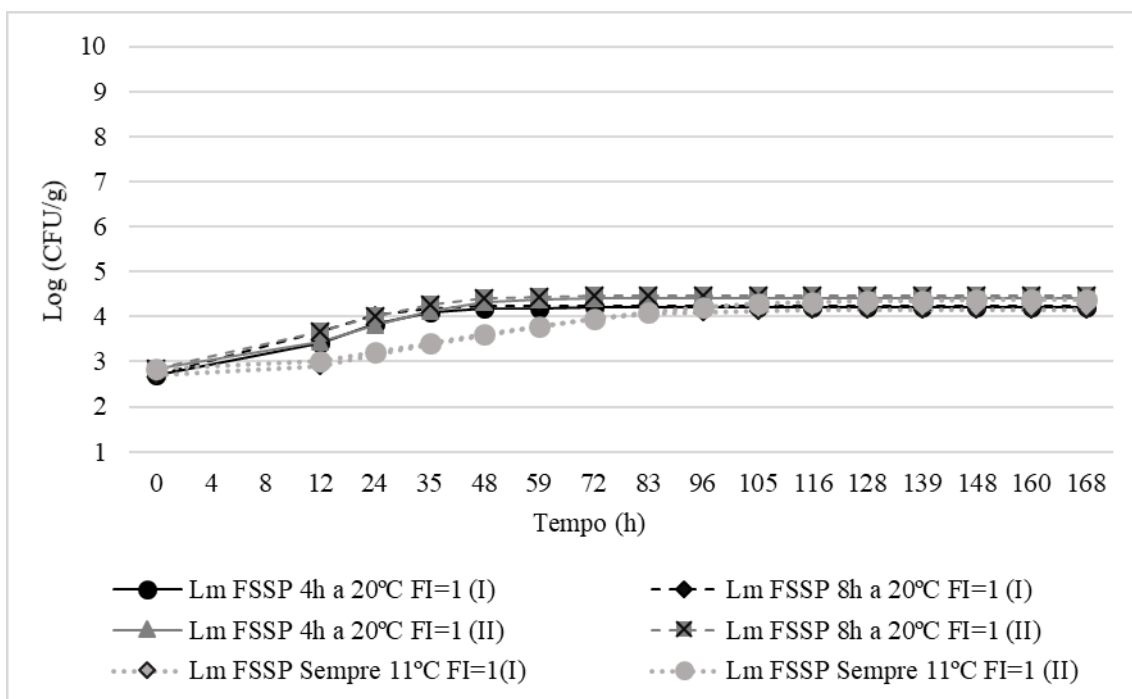
exposta a condições de temperatura constante (ex.: **ComBase 4 °C e 11° C**). Realçando ainda que a *L. monocytogenes* quando exposta a uma temperatura constante de 4 °C não apresenta capacidade de se desenvolver, mantendo-se apenas ativa durante todo o período de estudo.

Nas várias condições de estudo, observa-se um crescimento acentuado durante as primeiras 24 h em ambos os ensaios. No entanto, a partir desse momento o crescimento da bactéria estabiliza e apenas se observa um crescimento lento, mas gradual até ao fim dos 7 dias (168 h).

### 3.3.3. FSSP - maio

No modelo FSSP, foi utilizada a previsão de crescimento da *L. monocytogenes* e bactérias do ácido lático em produtos do mar e cárneos. Foi escolhido este modelo uma vez que a amostra em estudo demonstrou a presença de bactérias do ácido lático. Para isso foi utilizado o valor da concentração inicial que se obteve no primeiro ponto de amostragem.

No entanto, o programa prevê diferentes formas de ação das bactérias do ácido lático sobre *L. monocytogenes*. Como não foi realizado um estudo prévio do tipo de bactérias do ácido lático presentes na amostra em estudo optou-se por escolher um Fator de Efeito Inibitório das Bactérias do Ácido Lático (FEIBAL) de valor igual a 1, que indica a presença de bactérias do ácido lático.

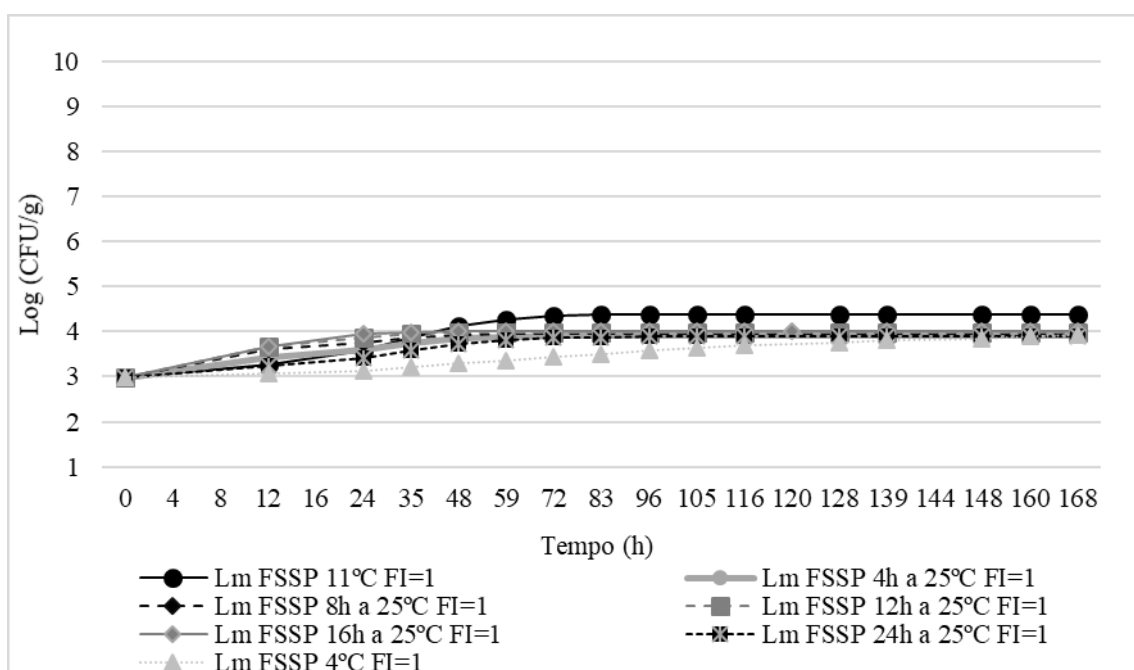


**Gráfico 8** – Representação gráfica dos valores obtidos no modelo de microbiologia preditiva – FSSP - na experiência I, ensaio 1e 2 – Fator efeito inibidor das bactérias do ácido lático (FEIBAL) = 1 - Condições de estudo: exposição a 20 °C durante 4 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm FSSP 4 h a 20 °C FI = 1 (I e II)); exposição a 20 °C durante 8 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm FSSP 8 h a 20 °C FI = 1 (I e II)) e armazenamento a 11 °C (Lm FSSP Sempre a 11 °C FI = 1 (I e II)).

Ao analisar o **gráfico 8**, observa-se que ao fim de aproximadamente 4 dias atinge-se um valor máximo de crescimento e por consequência, uma estagnação no desenvolvimento da *L. monocytogenes* durante os restantes dias.

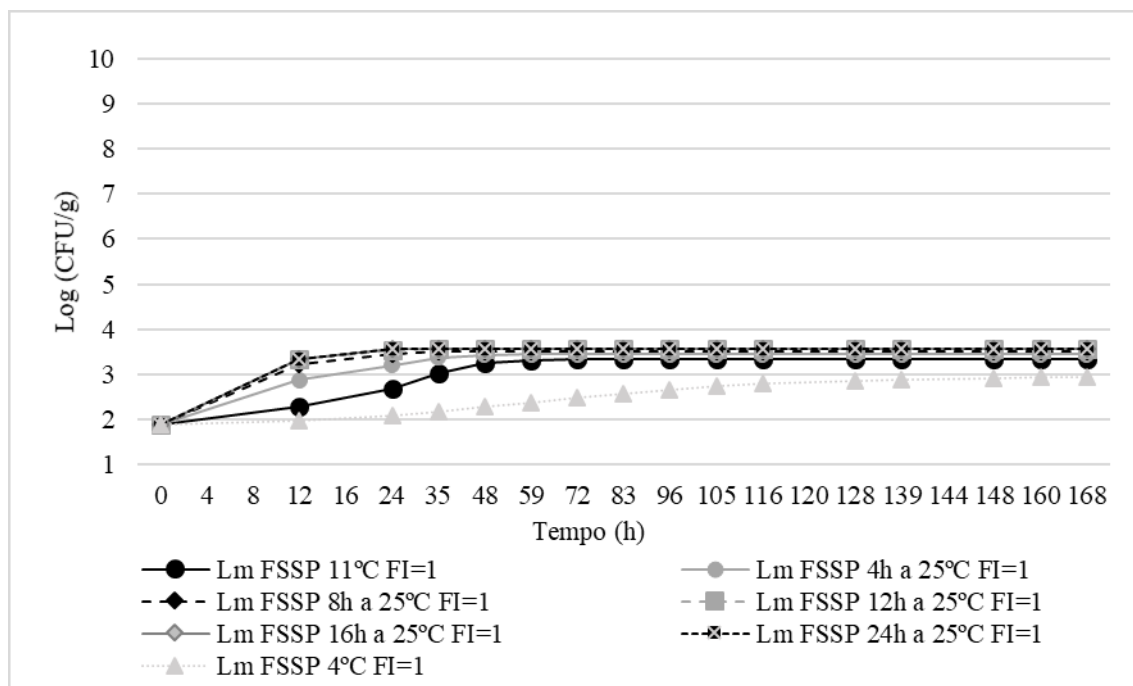
De entre as várias condições em estudo, não se observam diferenças significativas entre si. Porém, a condição **Lm FSSP Sempre 11 °C FI = 1 (I e II)**, apresenta nos primeiros dias uma progressão diferente das restantes condições. No entanto, esta última acaba por atingir valores similares às restantes condições de abuso.

### 3.3.4. FSSP - julho



**Gráfico 9** – Representação gráfica dos valores obtidos no modelo de microbiologia preditiva – FSSP - na experiência II, ensaio 1 - Fator efeito inibidor das bactérias do ácido lático (FEIBAL) = 1 - Condições de estudo: exposição a 25 °C durante 4 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm FSSP 4 h a 25 °C FI = 1); exposição a 25 °C

durante 8 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm FSSP 8 h a 25 °C FI = 1); exposição a 25 °C durante 12 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm FSSP 12 h a 25 °C FI = 1); exposição a 25 °C durante 16 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm FSSP 16 h a 25 °C FI = 1); exposição a 25 °C durante 24 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm FSSP 24 h a 25 °C FI = 1); armazenamento a 4 °C (Lm FSSP 4 °C FI = 1) e armazenamento a 11 °C (Lm FSSP 11 °C FI = 1).



**Gráfico 10** – Representação gráfica dos valores obtidos no modelo de microbiologia preditiva – FSSP - na experiência II, ensaio 2 - Fator efeito inibidor das bactérias do ácido lático (FEIBAL) = 1 - Condições de estudo: exposição a 25 °C durante 4 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm FSSP 4 h a 25 °C FI = 1); exposição a 25 °C durante 8 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm FSSP 8 h a 25 °C FI = 1); exposição a 25 °C durante 12 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm FSSP 12 h a 25 °C FI = 1); exposição a 25 °C durante 16 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm FSSP 16 h a 25 °C FI = 1); exposição a 25 °C durante 24 h seguida de armazenamento a 11 °C (Lm FSSP 24 h a 25 °C FI = 1); armazenamento a 4 °C (Lm FSSP 4 °C FI = 1) e armazenamento a 11 °C (Lm FSSP 11 °C FI = 1).

Analisando ambos os ensaios previstos pelo modelo FSSP (**gráfico 9 e 10**), não se verificam diferenças significativas entre si, voltando a observar-se um desenho gráfico similar à primeira experiência (**gráfico 8**).

Para além disso, observa-se novamente um crescimento acentuado de *L. monocytogenes* nos primeiros dias de amostragem, acabando por estabilizar e manter um crescimento constante até ao final dos sete dias. Verifica-se ainda que as condições **Lm FSSP 4 °C FI = 1 (gráfico 9 e 10)** e **Lm FSSP 11 °C FI = 1 (gráfico 10)**, apresentam um crescimento menos progressivo face às restantes condições. No entanto, em ambas as representações gráficas, as condições referidas anteriormente acabam por atingir valores similares às restantes condições de abuso. Porém, é importante referir que no **gráfico 9** a condição **Lm FSSP 11 °C FI = 1**, alcançou um crescimento superior face a todas as condições em estudo.

#### 4. Discussão

A análise dos **gráficos 1, 2, 3 e 4**, referentes às experiências realizadas durante os meses de maio e junho, observam-se algumas variações no crescimento de *L. monocytogenes* nas diversas condições de estudo. Essas oscilações de valores ao longo do período de estudo estabelecido, podem estar relacionados com a variabilidade inerente ao processo de inoculação das fatias de fiambre. No entanto, os decréscimos na população de *L. monocytogenes* observados em algumas das condições, podem também estar relacionados com a presença das bactérias do ácido lático uma vez que estas se encontram naturalmente presentes em elevado número nas amostras em estudo, exemplo disso é o **gráfico 2** onde se observa uma diminuição a partir do 4º dia até ao final do estudo.

Este tipo de bactérias são nativas em diversos habitats, como por exemplo, nas mais diversas categorias de alimentos e encontram-se presentes em elevado número face a outros microrganismos que compõe o microbioma dos alimentos.

As bactérias do ácido lático são conhecidas por serem produtoras de ácidos orgânicos (ex.: ácido lático e ácido acético) entre outros componentes antimicrobianos. Algumas destas bactérias são ainda capazes de produzir bacteriocinas, pequenos péptidos que desempenham um papel antimicrobiano importante no campo da conservação e segurança dos alimentos (Balciunas et al., 2016).

Estudos anteriores demonstram que a produção destes componentes por parte das bactérias do ácido lático podem gerar a redução e até mesmo a morte da bactéria *L. monocytogenes* em alimentos ao longo do tempo de vida (Grounta et al., 2016).

Outro fator que se verificou em ambas as experiências realizadas, foi a redução dos valores de pH ao longo do tempo (**Anexos – Tabela 1**), esta redução poderá estar associada à produção de ácidos orgânicos por parte das bactérias do ácido lático, que por consequência acidificam o meio causando uma diminuição de *L. monocytogenes* (Singh et al., 2009). Essas variações de pH podem também estar relacionadas com alterações sensoriais e com perecibilidade do produto, como foi o caso da alteração do aroma do fiambre sentido ao longo dos 7 dias de estudo, sendo importante realçar que a embalagem de ambas as marcas de fiambre utilizadas faziam referência à importância do consumo destes produtos em 3 dias após a abertura da embalagem, mencionando ainda que o seu armazenamento deve ser feito num intervalo de temperaturas entre os 0 °C e os 5 °C. Para além destas alterações referidas anteriormente, o crescimento em

simultâneo das bactérias do ácido láctico juntamente com *L. monocytogenes*, pode também gerar uma competição de nutrientes de forma a garantir a sobrevivência de uma destas bactérias. No caso em questão, as bactérias do ácido láctico como se encontravam em maior número acabaram por ter uma vantagem superior face a *L. monocytogenes*.

Pela análise dos resultados obtidos recorrendo aos modelos preditivos ComBase e FSSP (**gráfico 5, 6, 7, 8, 9 e 10**), observaram-se diferenças entre os comportamentos de *L. monocytogenes* previstos pelos modelos e os obtidos em laboratório.

No **gráfico 5**, encontra-se representado o desenvolvimento de *L. monocytogenes* previsto pelo modelo ComBase durante a 1ª experiência. Este último, anteviu um crescimento contínuo ao longo dos 7 dias de estudo, contrariamente ao que foi observado nos gráficos referentes aos valores reais, onde no caso do **gráfico 2** constatou-se um decréscimo de *L. monocytogenes* em todas as condições de estudo. Enquanto que no **gráfico 1**, observa-se um aumento em algumas das condições. No entanto, esse crescimento não demonstrou ser tão significativo quando comparado com os resultados gerados pelo modelo.

Analisando os **gráficos 6 e 7**, referentes aos resultados previstos pelo modelo ComBase para ambos os ensaios realizados durante a segunda experiência, verifica-se uma similaridade nas previsões, independentemente das variações observadas em ambos os ensaios realizados em laboratório. No entanto, a previsão que mais se aproxima da realidade é o segundo ensaio, onde se verifica um comportamento similar entre os **gráficos 4 e 7**.

Com a utilização deste modelo, foram constatadas algumas limitações face à representação total da realidade experienciada em laboratório. Durante a experiência, foram registadas variações de pH e de  $a_w$  ao longo do tempo, bem como um aumento de bactérias do ácido láctico. Essas variações observadas durante os dois ensaios realizados, nomeadamente as alterações dos valores de pH e a presença de uma microbiota indígena (ex.: bactérias do ácido láctico), seriam fatores que justificam as possíveis alterações no comportamento previsto de *L. monocytogenes*. Porém, o modelo em questão não contabiliza variações de pH e  $a_w$ , nem mesmo a presença de uma microbiota indígena, ou seja, o modelo apenas oferece a função de variação de temperatura ao longo do tempo dentro da opção “modelo dinâmico”.

Assim, para utilização do ComBase aplicou-se o modelo dinâmico onde foi possível fazer variar a temperatura ao longo do tempo. No entanto, para conseguir

ultrapassar a falta de uma função que represente as variações de pH foi necessário realizar as previsões por frações de tempo, ou seja, consoante as alterações dos valores do pH observados ao longo dos vários dias de amostragem, realizava-se uma nova previsão utilizando o último valor logarítmico obtido no modelo, bem como o novo valor de pH e  $a_w$  para assim gerar uma nova previsão. Para além disso, o modelo não contabiliza a possível ação das bactérias do ácido láctico no desenvolvimento de *L. monocytogenes* e por isso, não permite a representação total da realidade, uma vez que estes microrganismos podem ter uma grande influência quando presentes em elevado número.

Assim, os gráficos finais (**gráfico 6 e 7**) resultaram da junção de vários valores gerados pelo modelo ComBase onde prevê, independentemente de fatores externos, o crescimento de *L. monocytogenes* durante o período de estudo estabelecido. No entanto, perante a análise dos gráficos gerados por este modelo é possível constatar uma sobrevalorização dos resultados obtidos, ou seja, a representação final deste modelo estima sempre um desenvolvimento superior do patogénico face aos valores obtidos em laboratório. No entanto, se este modelo contabilizasse a presença das bactérias do ácido láctico o comportamento de *L. monocytogenes* iria apresentar diferenças significativas.

A análise referente aos **gráficos 8, 9 & 10** dizem respeito ao segundo modelo utilizado neste estudo, *Food Spoilage and Safety Predictor* (FSSP). Neste modelo, foi possível contabilizar a presença e o possível efeito inibidor de uma microbiota indígena, como é o caso das bactérias do ácido láctico e *L. monocytogenes*.

Este modelo para além de contabilizar a concentração inicial das bactérias do ácido láctico e os seus possíveis efeitos inibitórios sobre outro microrganismo, consegue também registar outros fatores, como é o caso da presença de ácidos orgânicos na fase aquosa do produto (ex.: ácido acético, ácido benzoico, etc) e também a possível presença de componentes derivados de processos de fumagem, como é o caso do fenol e a presença de nitratos. No entanto, para gerar os gráficos representados na secção anterior, apenas foram utilizados os parâmetros referentes às bactérias do ácido láctico e o seu possível efeito inibitório, bem como o primeiro valor obtido experimentalmente de pH e  $a_w$ , uma vez que não havia mais informação disponível sobre a amostra utilizada no estudo.

Este modelo ao contrário do ComBase, contabiliza a presença das bactérias do ácido láctico e o efeito que estas têm no comportamento de *L. monocytogenes* quando cresce em simultâneo com outros microrganismos.

O modelo contabiliza diferentes efeitos que as bactérias do ácido lático podem ter sobre *L. monocytogenes*, ou seja, estes microrganismos podem não demonstrar qualquer efeito sobre o patogénico e demonstrar assim um crescimento contínuo ao longo do tempo, como pode chegar ao extremo, causando a morte da bactéria. Assim, observa-se que a presença de uma microbiota indígena vai ter uma influência significativa no desenvolvimento de um determinado microrganismo patogénico, como o caso de *L. monocytogenes*.

Para além disso, é de referir que o efeito da exposição a temperaturas de abuso com diferentes períodos de tempo, não é tão significativo como esperado.

Durante a 1ª experiência (**gráfico 8**), observa-se que a condição **Lm FSSP Sempre 11 °C FI = 1 (I e II)**, demonstra um comportamento ligeiramente diferente face as restantes condições de estudo nas primeiras 48 h de estudo. *Listeria monocytogenes* quando exposta a uma temperatura constante de 11 °C apresenta um desenvolvimento inferior, o que pode indicar que a bactéria tem um período de adaptação diferente em relação a mesma bactéria que foi exposta a temperaturas de abuso. No entanto, a exposição a uma temperatura mais baixa, não impediu o desenvolvimento deste microrganismo a níveis iguais ou superiores ao das restantes condições de abuso. Segundo o que se observa neste modelo preditivo, independentemente de haver uma microbiota indígena presente na amostra em estudo e mesmo havendo exposições a temperaturas de abuso distintas, *L. monocytogenes* atinge valores similares entre todos os casos de estudo no final de 7 dias, ou seja, o desenvolvimento da bactéria não depende da temperatura a que foi exposta, mas do período que o microrganismo tem de incubação/ adaptação.

Pela análise dos **gráficos 9 e 10**, é possível observar que *L. monocytogenes* não apresenta diferenças significativas entre ensaios. No entanto, é importante realçar que nesta segunda experiência a condição **Lm FSSP 11 °C FI = 1** acaba por se destacar, uma vez que durante o primeiro ensaio (**gráfico 9**) se observaram valores ligeiramente superiores em comparação com as restantes condições de abuso, contrariamente ao que se observou no gráfico 8, referente ao primeiro estudo realizado. Porém, a condição **Lm FSSP 4 °C FI = 1** tal como esperado, demonstra valores inferiores em relação as restantes condições. No entanto, no caso do primeiro ensaio (**gráfico 9**) acaba por atingir valores similares às restantes condições, concluir-se

novamente que o modelo prevê que independentemente da temperatura de abuso, o período de incubação é que vai determinar se a bactéria se adapta e desenvolve atingindo níveis iguais ou superiores aos das restantes condições.

Contrariamente ao modelo ComBase, a presença das bactérias do ácido láctico vai afetar o tipo de desenvolvimento da *L. monocytogenes*, verificando-se que o crescimento deste microrganismo estabiliza aproximadamente ao fim de 48h de estudo, permanecendo constante até ao final da experiência. Isto acontece, porque possivelmente ocorre competição entre a *L. monocytogenes* e a microflora indígena presente na amostra. No entanto, o facto de a condição **Lm FSSP 11°C FI = 1** apresentar valores superiores no **gráfico 9**, pode indicar que as bactérias do ácido láctico não se encontravam tão adaptadas a essa temperatura e por isso, permitiu que *L. monocytogenes* apresentasse uma maior facilidade de sobrevivência. Isto é, as bactérias do ácido láctico são essencialmente mesófilicas (algumas exceções termofílicas), tendo um intervalo de temperaturas de crescimento entre os 5°C e os 45°C. Porém, as temperaturas ótimas para se desenvolverem encontram-se entre os 37 °C e os 40 °C. Assim, o facto de algumas das bactérias do ácido láctico terem sido expostas a temperaturas de abuso, permitiu que essas ganhassem vantagens de sobrevivência e crescimento em relação a *L. monocytogenes*, apresentando por isso uma ação inibitória maior em relação aquelas que se desenvolveram numa temperatura constante de 11°C. Porém, as bactérias do ácido láctico que foram expostas a diferentes períodos de temperatura de abuso possivelmente ganharam vantagens de crescimento em relação a *L. monocytogenes*, fazendo com que o desenvolvimento desta última seja afetado.

Realizando a comparação de todos os gráficos gerados durante este estudo, verifica-se que apenas o modelo ComBase demonstra um aumento logarítmico superior face às restantes representações gráficas, ou seja, os resultados que derivaram da experiência laboratorial e do modelo FSSP apresentaram apenas aumentos na ordem de 1 log UFC/ g.

O modelo ComBase não contabiliza a presença de uma microbiota indígena, como é o caso das bactérias do ácido láctico, bem como não regista variações de fatores como pH e  $a_w$ , estimando apenas o desenvolvimento de *L. monocytogenes* quando exposta a variações de temperaturas. Assim, os valores gerados pelo ComBase demonstram que o modelo é preventivo, pois estima uma sobrevalorização do crescimento do patogénico, principalmente nas condições de abuso, ou seja, os

resultados gerados por este modelo são os que menos se aproximam da realidade obtida em laboratório. No entanto, demonstram que *L. monocytogenes* possa desenvolver-se de forma preocupante e colocando em risco a saúde dos consumidores.

Contrariamente, o FSSP contabiliza a presença das bactérias do ácido láctico o que por sua vez gera valores diferentes do modelo ComBase. No entanto, para saber qual(ais) o(s) tipo(s) de bactérias do ácido láctico que estariam presentes nas amostras utilizadas no estudo deveria ter sido realizado um estudo prévio onde se identificava o tipo de bactérias do ácido láctico e se estas seriam ou não produtoras de bacteriocinas ou de outros compostos antimicrobianos. Assim, optou-se por seleccionar um efeito inibitório das bactérias do ácido láctico igual a 1 o qual pressupõe a presença desta microbiota indígena, mas sem contar com qualquer tipo de produção de compostos antimicrobianos.

Assim, este modelo demonstrou a sobrevivência da *L. monocytogenes* ao longo do tempo. No entanto, o facto de contabilizar a presença das bactérias do ácido láctico, o crescimento não é tão acentuado e por isso, mais similar ao observado em laboratório. Trata-se de um modelo preventivo, pois não demonstrou a morte da bactéria, mas sim que se mantém viva e constante ao longo do tempo, mas que devido a presença das bactérias do ácido láctico o crescimento não é tão acentuado como no modelo ComBase, pois certamente ocorre uma competição pela sobrevivência de cada uma destas espécies referidas anteriormente.

Em suma, o modelo que acaba por se aproximar mais da realidade obtida experimentalmente é o FSSP, uma vez que demonstra um desenvolvimento similar à realidade obtida em laboratório em ambas as experiências realizadas.

## 5. Conclusão

No final deste trabalho concluiu-se que foram cumpridos todos os objetivos estabelecidos no início deste estudo, onde foi simulado o efeito das temperaturas de abuso no desenvolvimento de *L. monocytogenes* numa matriz alimentar, bem como a comparação entre os valores obtidos laboratorialmente e a previsão gerada por dois modelos preditivos disponíveis online.

Os resultados confirmam que o fiambre é uma boa matriz alimentar para o desenvolvimento da *L. monocytogenes*. Este produto pronto a comer é frequentemente manipulado e fatiado. Por isso, é necessária uma especial atenção na forma como se manipula e armazena este alimento, pois os métodos de refrigeração reduzem a taxa de crescimento, mas não inibem o desenvolvimento da *L. monocytogenes*.

Este estudo, acaba por se diferenciar de outros, uma vez que inclui a análise do efeito das flutuações de temperatura numa matriz alimentar.

Analisando de uma forma generalizada os resultados obtidos neste estudo, concluiu-se que, o efeito das temperaturas de abuso não é tão significativo para o desenvolvimento da *L. monocytogenes*, mas sim o fator tempo. Assim, as temperaturas de abuso apenas favorecem um impulso no início do desenvolvimento do patogénico.

Para além disso, outro fator importante a referir e que acaba por ter uma grande influência na progressão da *L. monocytogenes* é a presença de uma microbiota indígena, como é o caso das bactérias do ácido láctico, pois favorece uma competição nutricional entre estas duas comunidades, mas também pode favorecer a inibição do patogénico caso esta microflora seja produtora de componentes antimicrobianos.

Face aos resultados obtidos nas previsões dos modelos preditivos, é possível concluir que existem diferenças significativas, o que facilmente ajuda na seleção do modelo que melhor se adequa a situação de estudo na experiência realizada.

Em particular, o ComBase foi o que apresentou resultados mais dispares face aos valores obtidos em ensaio laboratorial, uma vez que este modelo não contabiliza fatores como a presença da microbiota indígena e por consequência, a possível competição que ocorre entre as duas comunidades (*L. monocytogenes* e bactérias do ácido láctico) presentes nas amostras. Para além disso, não prevê o efeito das variações de pH e  $a_w$  ao longo do tempo. Assim, este modelo não seria o mais indicado nesta situação, uma vez que acaba por não representar na totalidade a realidade experienciada em laboratório e demonstrando no final, uma sobrevalorização no crescimento do patogénico.

Dentro dos modelos estudados, o modelo FSSP foi o que mais se aproximou dos resultados obtidos em laboratório, uma vez que ao contabilizar a presença de bactérias do ácido láctico, demonstra que *L. monocytogenes* é afetada pela presença dessa comunidade bacteriana que estava presente em elevado número e por isso, acaba por não apresentar tanta capacidade para se desenvolver naquele meio.

No entanto, neste modelo era possível selecionar os diversos efeitos inibidores que as bactérias do ácido láctico poderiam ter sobre o patogénico. Porém, como não foi realizado um estudo prévio para saber que tipo de bactérias do ácido láctico estavam presentes no estudo e uma vez que, esta comunidade pode variar ao longo do tempo e não ser a mesma entre amostras e lotes, acabava por não se justificar esse estudo, optando-se por um fator “neutro” que não contabilizava a produção de componentes antimicrobianos por parte das bactérias do ácido láctico.

Assim, o consumidor torna-se um fator crucial na prevenção da qualidade e segurança dos seus alimentos ao minimizar a exposição de alimentos perecíveis a variações de temperatura durante um longo período de tempo, minimizando os riscos microbiológicos.

Em suma, aconselha-se que em estudos futuros se simule a contaminação durante o processo de fatiar, observando-se o comportamento da *L. monocytogenes* até ao fim do prazo de validade estabelecido para o produto, como também a utilização de outras matrizes prontas a comer e outras combinações do binómio tempo/ temperatura.

Sugere-se ainda que se experimentem outros modelos preditivos e possivelmente, tentar desenvolver um modelo que contabilize as várias alterações dos fatores intrínsecos e extrínsecos em simultâneo, bem como contabilizar essas alterações ao longo do tempo, de forma a que seja possível prever com mais precisão o que se observa na realidade.

## 6. Referências Bibliográficas

Acciari, V. A., Iannetti, L., Gattuso, A., Sonnessa, M., Scavia, G., Montagna, C., Addante, N., Torresi, M., Zocchi, L., Scattolini, S., Centorame, P., Marfoglia, C., Prencipe, V. A., & Gianfranceschi, M. V. 2016. Tracing sources of *Listeria* contamination in traditional Italian cheese associated with a US outbreak: investigations in Italy. *Epidemiology & Infection*, 144(13), 2719-2727.

Akkermans, S., Nimmegeers, P., & Van Impe, J. F. 2018. A tutorial on uncertainty propagation techniques for predictive microbiology models: A critical analysis of state-of-the-art techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 282, 1-8.

Allerberger, F., & Wagner, M. 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(1), 16-23.

Arendt, S., Rajagopal, L., Strohhahn, C., Stokes, N., Meyer, J., & Mandernach, S. 2013. Reporting of foodborne illness by US consumers and healthcare professionals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(8), 3684-3714.

Authority, A. N. Z. F. 1987. Food standards code. Guidance on the application of microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in RTE food. Authority/Information Australia.

Balciunas, E. M., Al Arni, S., Converti, A., Leblanc, J. G., & Oliveira, R. P. D. S. 2016. Production of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) by *Bifidobacterium lactis* using whey as a substrate. *International Journal of Dairy Technology*, 69(2), 236-242.

Baranyi, J., & da Silva, N. B. 2017. The use of predictive models to optimize risk of decisions. *International Journal of Food Microbiology*, 240, 19-23.

Bovill, R. A., Bew, J., & Baranyi, J. 2001. Measurements and predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature: II. Rapidly changing temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 67(1-2), 131-137.

Callejón, R. M., Rodríguez-Naranjo, M. I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. 2015. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(1), 32-38.

Cartwright, E. J., Jackson, K. A., Johnson, S. D., Graves, L. M., Silk, B. J., & Mahon, B. E. 2013. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998–2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19(1), 1.

Carvalho, F., Sousa, S., & Cabanes, D. 2014. How *Listeria monocytogenes* organizes its surface for virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 48.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013. National *Listeria* Surveillance Annual Summary, 2011. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/listeria/pdf/listeriaannual-summary-2011-508c.pdf>Centers for Disease Control and Prevention. *Listeria* (Listeriosis): People at Risk. 2017. <https://www.cdc.gov/listeria/risk.html> - acedido a 24 de abril de 2019.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2017. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet 2015 Surveillance Report (Final Data). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2018. *Listeria* Outbreaks - <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html> - acedido a 24 de abril de 2019.

Churchill, K. J., Sargeant, J. M., Farber, J. M., & O'Connor, A. M. 2019. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Select Ready-to-Eat Foods - Deli Meat, Soft Cheese, and Packaged Salad: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Food Protection*, 82(2), 344-357.

Colás-Medà, P., Viñas, I., Oliveira, M., Anguera, M., Serrano, J. C., & Abadias, M. 2017. Exposure to minimally processed pear and melon during shelf life could modify the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 62, 275-281.

Comissão, D.C.E. 2005. Regulamento (CE) n° 2073/2005 da comissão, 15 novembro de 2015, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal da União Europeia*, L, 338/5 – artigo 2.º alínea g.

Contini, C., Romano, C., Scozzafava, G., & Casini, L. 2016. Food habits and the increase in ready-to-eat and easy-to-prepare products. In *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods*, pp. 3-14. Academic Press.

Conway, W. S., Leverentz, B., Saftner, R. A., Janisiewicz, W. J., Sams, C. E., & Leblanc, E. 2000. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut apple

slices and its interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum*. *Plant Disease*, 84(2), 177-181.

Cossu, F., Spanu, C., Deidda, S., Mura, E., Casti, D., Pala, C., Lamon, S., Spanu, V., Ibba, M., Marrocu, E., Scarano, C., Piana, A., & De Santis E. P. L. 2016. *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat sandwiches collected from vending machines. *Italian Journal of Food Safety*, 5(2).

Dalgaard, P. 2014. Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP) Software. In *Annual Report on Zoonoses in Denmark 2013*. DTU Food.

Dalgaard, P., & Mejlholm, O. 2019. Modeling Growth of *Listeria* and Lactic Acid Bacteria in Food Environments. In *Foodborne Bacterial Pathogens*, pp. 247-264. Humana Press, New York, NY.

Datta, A. R., Laksanalamai, P., & Solomotis, M. 2013. Recent developments in molecular sub-typing of *Listeria monocytogenes*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(8), 1437-1445.

De Castro, V., Escudero, J., Rodriguez, J., Muniozguren, N., Uribarri, J., Saez, D., Vazquez, J. 2012. Listeriosis outbreak caused by Latin-style fresh cheese, Bizkaia, Spain, August 2012. *EuroSurveillance*, Volume 17, Issue 42.

Den Bakker, H. C., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S., Stasiewicz, M. j., Burrell, A., Roof, S., Strawn, L. k., Fortes, E., Nightingale, K. K., Kephart, D., & Wiedman, M. 2014. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(6), 1882-1889.

Denny, J., McLauchlin, J., 2008. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe - an opportunity for improved European surveillance. *EuroSurveillance*, Volume 13, Issue 13.

Dewey-Mattia, D., Manikonda, K., Hall, A. J., Wise, M. E., & Crowe, S. J. 2018. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks—United States, 2009–2015. *MMWR Surveillance Summaries*, 67(10), 1.

Di Ciccio, P., Meloni, D., & Ianieri, A. 2015. *Listeria monocytogenes*: Growth in biofilms and in the food industry. *Listeria monocytogenes: Incidence, Growth Behavior and Control*. New York, USA: Nova Science Publishers, Inc, 37-57.

Disson, O., Grayo, S., Huillet, E., Nikitas, G., Langa-Vives, F., Dussurget, O., Ragon, M., Le Monnier, A., Baninet, C., Cossart, P., & Lecuit, M. 2008. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature*, 455(7216), 1114.

Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P., 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3819-3822.

EFSA & ECDC, 2018 - The UE summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017 - Aprovado em 19 de novembro de 2018.

EFSA, 2007. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. *The EFSA Journal* (2007) 599, 1-42. EFSA J. 1–42.

EFSA, ECDC, 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012, No. 12(2):3547, *EFSA Journal*.

European Centre for Disease Prevention and Control. Listeriosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2015. Stockholm: ECDC; 2018.

European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15(12), e05077.

European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15(12), e05077.

European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 2017, 15, e5077.

European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 2016, 14, e04634.

European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 2015, 13, 4329.

European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal*, 2010, 8, 1496

European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005. *EFSA Journal*, 2006, 4, 94.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12), e05500.

Food and Drug Administration. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. [chapter title, pp. *Listeria monocytogenes*]. 2012

Food Standards Australia New Zealand (FSANZ) 2014. Guidance on the application of microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in RTE food. <http://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/Guidance%20on%20the%20application%20of%20limits%20for%20Listeria%20monocytogenes%20FINAL.pdf> -  
accedido a 24 de abril de 2019.

Food Standards Australia New Zealand. *Listeria*: Food Safety and Recalls. 2017. <http://www.foodstandards.gov.au/consumer/safety/listeria/Pages/default.aspx> -  
accedido a 24 de abril de 2019.

Fretz R, Pichler J, Sagel U, Much P, Ruppitsch W, Pietzka AT, Stöger A, Huhulescu S, Heuberger S, Appl G, Werber D, Stark K, Prager R, Fliieger A,

Karpíšková R, Pfaff G, Allerberger F. Update: Multinational listeriosis outbreak due to ‘Quargel’, a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009-2010 . *EuroSurveillance*. 2010;15(16):pii=19543. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19543>

FSSP – Food Spoilage and safety predictor - Technical University of Denmark – DTU - <http://fssp.food.dtu.dk/> - accedido a 28 de abril de 2019.

Gambarin, P., Magnabosco, C., Losio, M. N., Pavoni, E., Gattuso, A., Arcangeli, G., & Favretti, M. 2012. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood and potential hazards for the consumers. *International Journal of Microbiology*, 2012, Article ID 497635

Gómez, D., Azón, E., Marco, N., Carramiñana, J.J., Rota, C., Ariño, A., Yangüela, J. 2014. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiology*, 42, 61–65.

Goulet, V., Hedberg, C., Le Monnier, A., de Valk, H. 2008. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerging Infectious Disease*. 14, 734–740. doi:10.3201/eid1405.071395

Granados, L. R., Pérez, F., & Valero, A. 2018. Food Quality Management Systems in the Dairy Industry: A Case Study on the Application of Predictive Microbiology in the Microbial Quality of Milk. In *Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing*. IntechOpen.

Gray, M. L., & Killinger, A. H. 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological Reviews*, 30(2), 309.

Grounta, A., Harizanis, P., Mylonakis, E., Nychas, G. J. E., & Panagou, E. Z. 2016. Investigating the effect of different treatments with lactic acid bacteria on the fate of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* infection in *Galleria mellonella* larvae. *PloS One*, 11(9), e0161263.

Heintz, E., Van Lent, H. J., Vega, L., & Glass, K. 2018. The inhibitory effect of a sodium free powder preservative on the growth of *Listeria monocytogenes* and lactic acid bacteria in turkey ham applications. *Meat and Muscle Biology*, 1(2), 134-135.

Heir, E., Møretrø, T., Simensen, A., & Langsrud, S. 2018. *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and

suspensions with bacteria from food processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 275, 46-55.

Hernandez-Milian, A., & Payeras-Cifre, A. (2014). What is new in listeriosis?. *BioMed Research International*, 2014.

Huang, L. 2017. Dynamic kinetic analysis of growth of *Listeria monocytogenes* in a simulated comminuted, non-cured cooked pork product. *Food Control*, 71, 160167.

Iranzo E. O. et al., 2015. *Listeria monocytogenes* nas indústrias das carnes (1º Edição, março 2015). *Betelgeux*. Trotta consulting.

Jackson, K. A., Biggerstaff, M., Tobin-D'Angelo, M., Sweat, D., Klos, R., Nosari, J., Garrison, O., Boothe, E., Saathoff- Huber, L., Hainstock, L., & Fagan, R. P. 2011. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* associated with Mexican-style cheese made from pasteurized milk among pregnant, Hispanic women. *Journal of Food Protection*, 74(6), 949-953.

Johnson, J., Jinneman, K., Stelma, G., Smith, B. G., Lye, D., Messer, J., Ulaszek, J., Evsen, L., Gendel, S., Bennett, R. W., Swaminathan, B., Pruckler, J., Steigerwalt, A., Kathariou, S., Yildirim, S., Volokhov, D., Rasooly, A., Chizhikov, V., Wiedmann, Fortes, M., Duvall, R. E., & Hitchins, A. D. 2004. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4256-4266.

Jurkiewicz, A.; Oleszczak-Momot, W. *Listeria monocytogenes* jako problem zdrowia publicznego. *Med. Og. Nauk. Zdr.* 2015, 21, 29–32. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, & World Health Organization. (2007). *Codex Alimentarius Commission: procedural manual*. Food & Agriculture Org.

Karpísková, R., Pfaff, G., Allerberger, F., 2010. Update: Multinational listeriosis outbreak due to “Quargel”, a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009-2010. *EuroSurveillance. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull*, 15.

Kataoka, A., Wang, H., Elliott, P. H., Whiting, R. C., & Hayman, M. M. 2017. Growth of *Listeria monocytogenes* in thawed frozen foods. *Journal of Food Protection*, 80(3), 447-453.

Kennedy, J., Jackson, V., Cowan, C., Blair, I., McDowell, D., & Bolton, D. 2005. Consumer food safety knowledge: Segmentation of Irish home food preparers based on food safety knowledge and practice. *British Food Journal*, 107(7), 441-452.

Koch, J., Dworak, R., Prager, R., Becker, B., Brockmann, S., Wicke, A., Wichmann-Schauer, H., Hof, H., Werber, D., Stark, K., 2010. Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006-2007. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 1581–1584. doi:10.1089/fpd.2010.0631

Kosa, K. M., Cates, S. C., Karns, S., Godwin, S. L., & Chambers, D. 2007. Consumer home refrigeration practices: results of a web-based survey. *Journal of Food Protection*, 70(7), 1640-1649.

Koutsoumanis, K. P., Kendall, P. A., & Sofos, J. N. 2004. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology*, 21(4), 415-422.

Le, A. M., & Leclercq, A. 2009. *Listeria* and listeriosis: from farm to fork. *Pathologiebiologie*, 57(1), 17-22.

Lechowicz, J., & Krawczyk-Balska, A. 2015. An update on the transport and metabolism of iron in *Listeria monocytogenes*: the role of proteins involved in pathogenicity. *Biometals*, 28(4), 587-603.

Lianou, A., Moschonas, G., Nychas, G. J. E., & Panagou, E. Z. 2018. Growth of *Listeria monocytogenes* in pasteurized vanilla cream pudding as affected by storage temperature and the presence of cinnamon extract. *Food Research International*, 106, 1114-1122.

Linscott, A. J. 2011. Food-borne illnesses. *Clinical Microbiology Newsletter*, 33(6), 41-45.

Little, C. L., & Gillespie, I. A. 2008. Prepared salads and public health. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 1729-1743.

Locatelli, A., Spor, A., Jolivet, C., Piveteau, P., & Hartmann, A. 2013. Biotic and abiotic soil properties influence survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *PLoS One*, 8(10), e75969.

Lotfollahi, L., Chaharbaresh, A., Rezaee, M. A., & Hasani, A. 2017. Prevalence, antimicrobial susceptibility and multiplex PCR-serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from humans, foods and livestock in Iran. *Microbial Pathogenesis*, 107, 425-429.

Magalhães, R., Almeida, G., Ferreira, V., Santos, I., Silva, J., Mendes, M. M., ... & Farber, J. 2015. Cheese-related listeriosis outbreak, Portugal, March 2009 to February 2012. *Eurosurveillance*, 20(17), 21104.

Mateus, T., Silva, J., Maia, R. L., & Teixeira, P. 2013. Listeriosis during pregnancy: a public health concern. *ISRN Obstetrics and Gynecology*, 2013, Article ID 851712.

McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdonc, W.J. and Jewell, K. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92: 15-33.

McLaughlin, J., & Rees, C. E. D. 2009. Genus I. *Listeria*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 244-257.

McNeill, C., Sisson, W., & Jarrett, A. 2017. Listeriosis: A resurfacing menace. *The Journal for Nurse Practitioners*, 13(10), 647-654.

Mejlholm, O., & Dalgaard, P. 2015. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and psychrotolerant lactic acid bacteria in processed seafood and mayonnaise-based seafood salads. *Food Microbiology*, 46, 1-14.

Muñoz-Cuevas, M., Fernández, P. S., George, S., & Pin, C. 2010. Modeling the lag period and exponential growth of *Listeria monocytogenes* under conditions of fluctuating temperature and water activity values. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9), 2908-2915.

Newell, G. D., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, M., Scheutz, F., Van der Giessen, J., & Kruse, H. 2010. Food-borne diseases—the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139, S3-S15.

Nyhan, L., Begley, M., Mutel, A., Qu, Y., Johnson, N., & Callanan, M. 2018. Predicting the combinatorial effects of water activity, pH and organic acids on *Listeria* growth in media and complex food matrices. *Food Microbiology*, 74, 75-85.

O'Brien, S. J., Elson, R., Gillespie, I. A., Adak, G. K., & Cowden, J. M. 2002. Surveillance of foodborne outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales 1992–1999: contributing to evidence-based food policy. *Public Health*, 116(2), 75-80.

Osman, M., & Nelson, W. 2019. How can food futures insight promote change in consumers' choices, are behavioural interventions (eg nudges) the answer. *Futures*.

Orsi, R. H., & Wiedmann, M. 2016. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5273-5287.

Osimani, A., & Clementi, F. 2016. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in mass catering: An overview in the European Union. *International Journal of Hospitality Management*, 57, 9-17.

Pearce, R. A., Bolton, D. J., Sheridan, J. J., McDowell, D. A., Blair, I. S., & Harrington, D. 2004. Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems. *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), 331-339.

Perez-Rodriguez, F., & Valero, A. 2013. Predictive microbiology in foods. In *Predictive Microbiology in Foods* (pp. 1-10). Springer, New York, NY.

Prokop, A., Gouin, E., Villiers, V., Nahori, M. A., Vincentelli, R., Duval, M., ... & Dussurget, O. 2017. OrfX, a nucleomodulin required for *Listeria monocytogenes* virulence. *MBio*, 8(5), e01550-17.

Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Escámez, P.S.F., Girones, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Nørrung, B., Roberttson, L., RuG., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Kuile, B.T., Threlfall, J., Wahlstroëm, H., Takkinen, J., Wagner, M., Arcella, D., Da Silva Felicio, M.T., Georgiadis, M., Messens, W., Lindqvist, R. 2018. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal*, 16.

Rocourt, J., BenEmbarek, P., Toyofuku, H., & Schlundt, J. 2003. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(3), 263-267.

Romick, T. L., Fleming, H. P., & McFeeters, R. F. 1996. Aerobic and anaerobic metabolism of *Listeria monocytogenes* in defined glucose medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), 304-307.

Rothrock Jr, M. J., Davis, M. L., Locatelli, A., Bodie, A., McIntosh, T. G., Donaldson, J. R., & Ricke, S. C. 2017. *Listeria* occurrence in poultry flocks: detection and potential implications. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 125.

Sant'Ana, A. S., Barbosa, M. S., Destro, M. T., Landgraf, M., & Franco, B. D. 2012. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelflife. *International Journal of Food Microbiology*, 157(1), 52-58.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L. & Griffin, P. M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7.

Scholliers, P. 2015. Convenience foods. What, why, and when. *Appetite*, 94, 2-6.

Scott J. & Mickey P. 2017. Control of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods: *Draft Guidance Federal Register / Vol. 82, No. 10. FDA CFSA*.

Seveau, S. 2014. Multifaceted activity of listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*. In *MACPF/CDC Proteins-Agents of Defence, Attack and Invasion* (pp. 161-195). Springer, Dordrecht.

Sheen, S., & Hwang, C. A. 2008. Modeling transfer of *Listeria monocytogenes* from slicer to deli meat during mechanical slicing. *Foodborne pathogens and Disease*, 5(2), 135-146.

Singh, S., Goswami, P., Singh, R., & Heller, K. J. 2009. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: a review. *LWT-Food Science and Technology*, 42(2), 448-457.

SNS 24 – Serviço Nacional de Saúde – Alertas – Surto de Listeriose em Espanha (6 de setembro de 2019) - <https://www.sns24.gov.pt/alerta/surto-de-listeriose-em-espanha/> - acessado a 20 de setembro de 2019.

Sousa, A., Bonito, C. C., Sousa, I., Toscano, M. M., Moura, I. B., Lopes, T. T., Pena, C., Cunha, I., C., Saraiva, M., & Calhau, M. A. 2016. Challenge tests para avaliar o período de vida útil secundário em fiambre fatiado pré-embalado. *Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP. Observações – Boletim epidemiológico*. 2016. Artigos breves\_ n. 13. Número especial 8, 2ª série.

Stahl, V., Ndoye, F. T., El Jabri, M., Le Page, J. F., Hezard, B., Lintz, A., Geeraerd, A. H., Alvarez, G., & Thuault, D. 2015. Safety and quality assessment of ready-to-eat pork products in the cold chain. *Journal of Food Engineering*, 148, 43-52.

Stea, E. C., Purdue, L. M., Jamieson, R. C., Yost, C. K., Truelstrup Hansen, L. 2015. Comparison of the prevalences and diversities of *Listeria* species and *Listeria*

*monocytogenes* in an urban and a rural agricultural watershed. *Applied and Environmental Microbiology* 81:3812–3822. doi: 10.1128/AEM.00416-15

Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9(10), 1236-1243.

Tahoun, A. B., Elez, R. M. A., Abdelfatah, E. N., Elsohaby, I., El-Gedawy, A. A., & Elmoslemany, A. M. 2017. *Listeria monocytogenes* in raw milk, milking equipment and dairy workers: molecular characterization and antimicrobial resistance patterns. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 10, 264-270.

Tamplin, M. L. 2018. Integrating predictive models and sensors to manage food stability in supply chains. *Food Microbiology*, 75, 90-94.

Tenenhaus-Aziza, F., & Ellouze, M. 2015. Software for predictive microbiology and risk assessment: a description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair. *Food Microbiology*, 45, 290-299.

US Centers for Disease Control and Prevention. CDC, Foodborne Active Surveillance Network (FoodNet) population survey atlas of exposures. 2006–2007. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2007.

US Department of justice. Delaware cheese company agrees to plead guilty to food adulteration charge, signs consent decree. 2016. <https://www.justice.gov/opa/pr/> - acedido a 28 de abril de 2019.

US food & drug administration. Center for food safety & applied nutrition. 2004. *Bad Bug Book: Foodborn Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*. International Medical Publishing.

US Food and Drug Administration and Health Canada. Joint FDA/ Health Canada quantitative assessment of the risk of listeriosis from soft-ripened cheese consumption in the United States and Canada: report. 2015. <http://www.fda.gov/> - (Food/FoodScienceResearch/RiskSafetyAssessment) acedido a 24 de abril de 2019.

US Food and Drug Administration. FDA investigation summary— multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* linked to certain Crave Brothers Farmstead Classics Cheeses. 2014. <https://www.fda.gov/> (Food/ RecallsOutbreaksEmergencies/Outbreaks) - acedido a 24 de abril de 2019.

US Food and Drug Administration. Queseria Chipilo, Inc. 3/3/11 warning letter. 2011. <http://fda-warningletters.blogspot.com/2011/03/queseria-chipilo-inc-3311.html>~

Wagner, M., & McLauchlin, J. 2008. *Biology*, [in:] *Handbook of Listeria monocytogenes*. Red. Liu D.

Walker, S. J., Archer, P., & Banks, J. G. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 68(2), 157-162.

Wang, G., Qian, W., Zhang, X., Wang, H., Ye, K., Bai, Y., & Zhou, G. 2015. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat meat products in Nanjing, China. *Food Control*, 50, 202-208.

Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., & den Bakker, H. C. 2015. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(1), 286-292.

World Health Organization (WHO) – Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007–2015. WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases. *Switzerland: World Health Organization (WHO)*, 2015.

World Health Organization (WHO), 2018 - Listeriosis, fevereiro de 2018 - World Health Organization, <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/listeriosis/en/> acessado a 23 de abril de 2019.

World Health Organization (WHO). 2004. *Risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods: technical report*. Food & Agriculture Org.

Yde, M., Naranjo, M., Mattheus, W., Stragier, P., Pochet, B., Beulens, K., De Schrijver, K., Van den Branden, D., Laisnez, V., Flipse, W., Leclercq, A., Lecuit, M., Dierick, K., Bertrand, S., 2012. Usefulness of the European Epidemic Intelligence Information System in the management of an outbreak of listeriosis, Belgium, 2011. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull*, 17.

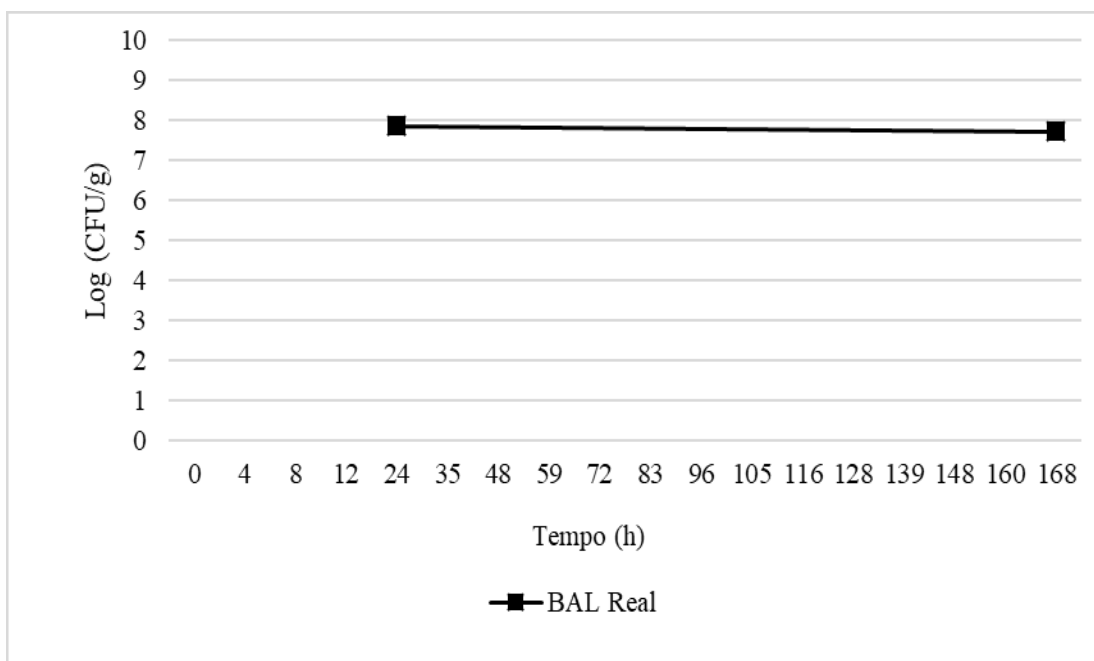
Yu, T., & Jiang, X. 2014. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail food in Henan, China. *Food Control*, 37, 228-231.

Zhang, C. X., Brooks, B. W., Huang, H., Pagotto, F., & Lin, M. 2016. Identification of surface protein biomarkers of *Listeria monocytogenes* via bioinformatics and antibody-based protein detection tools. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5465-5476.

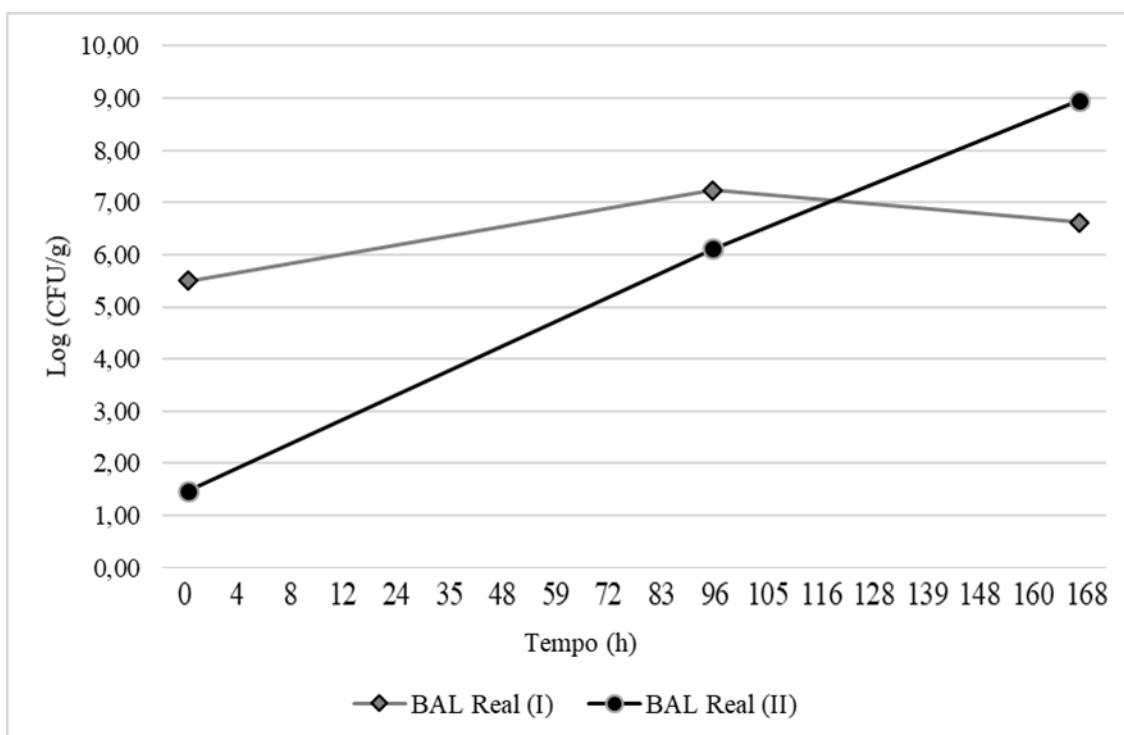
Zhang, J., Cao, G., Xu, X., Allard, M., Li, P., Brown, E., Yang, X., Pan, H., & Meng, J. 2016. Evolution and diversity of *Listeria monocytogenes* from clinical and food samples in Shanghai, China. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1138.

Zhu, Q., Gooneratne, R., & Hussain, M. 2017. *Listeria monocytogenes* in fresh produce: outbreaks, prevalence and contamination levels. *Foods*, 6(3), 21.

## Anexos



**Gráfico 11** – Representação gráfica dos valores referentes crescimento das bactérias do ácido láctico durante a primeira experiência do segundo ensaio realizado em laboratório - Condição de estudo: BAL Rea a 11°C.



**Gráfico 12** – Representação gráfica dos valores referentes crescimento das bactérias do ácido lático durante a segunda experiência do primeiro (I) e segundo (II) ensaio realizado em laboratório - Condição de estudo: BAL Real (I e II) a 11°C.

**Tabela 2** – Valores de pH e  $a_w$  obtidos durante a 1º e 2º experiência ao longo dos 7 dias de estudo.

Tempo (h)	EXP I				EXP II			
	pH 1	aw 1	pH 2	aw 2	pH 1	aw 1	pH 2	aw 2
0	6,21	0,996	6,27	0,98	5,82	0,975	6,11	0,98867
4								
8								
12								
16								
24	6,19	0,994	6,61	0,98	5,91		6,13	
35								
48	6,31	0,997	6,04	0,98	5,94		6,11	
59								
72					5,7		6,05	
83								
96	6,44	0,987	5,80	0,98	5,35	0,99	5,96	0,984
105								
116								
120					5,35		5,83	
128								
139								
144								
148								
160								
168	6,00	0,993	5,28	0,98	5,09	0,979	5,78	0,985

**Tabela 3** – Surtos de listeriose que ocorreram no mundo entre 1981-2018.

Surtos de Listeriose que ocorrem no mundo								
	Ano	País	Matriz Alimentar	Nº Casos	Hospitalizações	Mortes	Serótipo	Referências
USA	1981	Canada	Coleslaw	41	NA	18	4b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
	1983	Massachusetts, USA	Pasteurized milk	49	NA	14	4b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
UE	1983-1987	Suíça	Queijo Vacherin Mont d'or	122	ND	34	4b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
	1986	Áustria	Leite não pasteurizado	NA	ND	ND	ND	Lundén J., et al., 2004
	1987-1989	Reino Unido	Patê	366	ND	ND	4b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
	1989-1990	Dinamarca	Queijo de bolor azul	26	ND	7	4b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
	1992	França	Língua de porco em geleia	279	ND	85	4b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
EUA	1992	Califórnia, USA	Queijo estilo mexicano	142	ND	48	4b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
UE	1993	França	Rilletes	38	ND	10	4b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
	1993	Norte de Itália	Salada de arroz	18	ND	ND	1/2b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
EUA	1994	Illinois, USA	Chocolate de Leite	44	ND	ND	1/2b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
UE	1995	França	Queijo Brie com leite não pasteurizado	NA	ND	ND	ND	Lundén J., et al., 2004
	1997	Norte Itália	Milho frio e	1566	ND	ND	4b	Swaminathan B. & Gener-

			salada de atum					Smidt P., 2007
	1998	Finlândia	Peixe fumado a frio	NA	ND	ND	1/2a	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
<b>EUA</b>	1998	Vários Estados	Salsichas	108	101	14	4b	Mead P. S. et al., 2006
		Vários Estados	Salsichas	4	ND	ND	ND	Mead P. S. et al., 2006
<b>EUA</b>	1998-1999	Vários Estados	Cachorro Quente	108	ND	14	4b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
<b>EU</b>		Finlândia	Manteiga	25	ND	6	3a	Lundén J., et al., 2004
<b>EUA</b>	1999	1 Estado	Desconhecido	6	ND	ND	ND	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
		1 Estado	Salsichas	4	ND	ND	1/2a	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
		1 Estado	Produtos de charcutaria	5	5	1	ND	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
		Vários Estados	Patê	11	ND	ND	1/2a	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
		1 Estado	Produtos de charcutaria	2	2	1	ND	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
<b>EU</b>	1999	Finlândia	Manteiga	25	ND	6	3a	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
	1999-2000	França	Rilletes	10	ND	3	4b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
		França	Língua de porco em gelatina	32	ND	10	4b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
<b>Austrália</b>	2000	Nova Zelândia	Produtos de charcutaria	32	ND	ND	1/2(?)	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
<b>EU</b>	2000	Portugal	Queijo	1	ND	ND	ND	Eurosurveillance, 2005
	2000	Espanha	Indeterminado	15	ND	ND	ND	Eurosurveillance, 2005

<b>EUA</b>	2000	Carolina do Norte, EUA	Queijo estilo Mexicano	13	13	5	4b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
		Vários Estados	Produtos de charcutaria	30	29	7	1/2a	Olsen S. J. et al., 2005
	2001	Califórnia, EUA	Produtos de carne de frango prontos a comer	16	ND	ND	1/2a	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
<b>EU</b>	2001	Suécia	Queijo de leite cru	48	ND	ND	1/2a	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
	2001	Bélgica	Bolo de gelado	3	ND	ND	ND	Eurosurveillance, 2005
<b>Ásia</b>	2001	Japão	Queijo	38	ND	ND	1/2b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
<b>EUA</b>	2001	1 Estado	Produtos de charcutaria	28	0	0	1/2a	Gottlieb S. L. et al., 2006
<b>EU</b>	2002	França	Salsicha crua	11	ND	ND	ND	Eurosurveillance, 2005
<b>EUA</b>	2002	Vários Estados	Produtos de charcutaria	54	ND	8	4b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
	2003	1 Estado	Desconhecido	3	ND	ND	4b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
		Texas, EUA	Queijo estilo mexicano	12	12	1	4b	Buchanan R. L., et al., 2017
	2005	1 Estado	Desconhecido	6	6	0	4b	Swaminathan B. & Gener-Smidt P., 2007
	2008	Canada	Produtos de charcutaria fatiados	57	ND	22	ND	Food Safety Authority of Ireland (2011)
<b>EU</b>	2009	Vários Estados (3 Surtos)	Queijo e Carne de Porco	40	ND	11	1/2a (?)	Food Safety Authority of Ireland (2011)

	2009-2012	Portugal	Queijo	30	ND	ND	ND	Magalhães R., et al., 2015
<b>EUA</b>	2010	Texas, EUA	Aipo pré-cortado	10	ND	5	ND	Gaul L. K., et al., 2013
	2010-2015	ND	Gelado	9	9	2	1/2b; 1/2a; 3b	Chen Y., et al., 2016 & Pouillot R., et al., 2016
	2011	Vários Estados	Meloa	147	99%	33 (1 aborto)	1/2a; 1/2b	CDC, 2011
	2014	ND	Rebentos de feijão mungo	5	5	2	ND	CDC, 2015b
		Califórnia, EUA	Frutos com caroço	4	ND	ND	ND	Buchanan R. L., et al., 2017
	2014-2015	ND	Maças caramelizadas	35	34	7 (1 aborto)	ND	CDC, 2015c
	2013	27 Estados Membros	ND	1763	ND	ND	ND	EFSA, 2015
<b>UE</b>	2015	Vários Estados Membros	Mix de vegetais congelados	47	ND	9	ND	EFSA Journal & ECDC, 2018
	2018	5 Estados Membros da UE	Milho Congelado	32	ND	6	ND	EFSA Journal & ECDC, 2018
<b>UE</b>	2019	Espanhã (Andaluzia)	Lote de carne picada marca “La Mechá” e “Sabores de Paterna”	±200	ND	3 mortes 7 abortos (?)	ND	SNS 24, 6 de setembro de 2019
ND = Não Definido EUA = Estado Unidos da América EU = União Europeia								

