



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**ENIALE DE MELO OLIVEIRA**

**MODELAGEM DO EFEITO COMBINADO DE ATIVIDADE DE ÁGUA, CLORETO  
DE SÓDIO E TEMPERATURA EM SISTEMA MODELO SOCOL:  
COMPORTAMENTO DE *Listeria monocytogenes* E INATIVAÇÃO EM FLUIDO  
GÁSTRICO SIMULADO**

ALEGRE – ES

ABRIL – 2024

ENIALE DE MELO OLIVEIRA

**MODELAGEM DO EFEITO COMBINADO DE ATIVIDADE DE ÁGUA, CLORETO  
DE SÓDIO E TEMPERATURA EM SISTEMA MODELO DE SOCOL:  
COMPORTAMENTO DE *Listeria monocytogenes* E INATIVAÇÃO EM FLUIDO  
GÁSTRICO SIMULADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Patrícia Campos Bernardes

Coorientadores: Prof<sup>a</sup>. Dra. Consuelo Domenici Roberto

Dr. Denes Kaic Alves do Rosário

ALEGRE – ES

ABRIL – 2024

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

O48m Oliveira, Eniale de Melo, 1999-  
Modelagem do efeito combinado de atividade de água,  
cloreto de sódio e temperatura em sistema modelo de Socol :  
comportamento de *Listeria monocytogenes* e inativação em fluido  
gástrico simulado / Eniale de Melo Oliveira. - 2024.  
63 p. : il.

Orientadora: Patrícia Campos Bernardes.

Coorientadores: Consuelo Domenici Roberto, Denes Kaic  
Alves do Rosário.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de  
Ciências Agrárias e Engenharias.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Alimentos - Microbiologia. 3.  
Modelagem. 4. Alimentos de origem animal. I. Bernardes,  
Patrícia Campos. II. Roberto, Consuelo Domenici. III. do  
Rosário, Denes Kaic Alves. IV. Universidade Federal do  
Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V.  
Título.

CDU: 664

---

## **ENIALE DE MELO OLIVEIRA**

# **“MODELAGEM DO EFEITO COMBINADO DE ATIVIDADE DE ÁGUA, CLORETO DE SÓDIO E TEMPERATURA EM SISTEMA MODELO SOCOL: COMPORTAMENTO DE *LISTERIA* *MONOCYTOGENES* E INATIVAÇÃO EM FLUIDO GÁSTRICO SIMULADO.”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 26 de abril de 2024.

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Campos Bernardes  
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES  
Orientadora

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Consuelo Domenici Roberto  
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES  
Coorientadora

---

Dr. Denes Kaic Alves do Rosário  
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES  
Coorientador

---

Prof. Dr. João Paulo Natalino de Sá  
Universidade Federal de Sergipe - UFS  
Membro Externo

---

Prof. Dr. Sérgio Henriques Saraiva  
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES  
Membro Interno





## Documentos defesa mestrado Eniale

Data e Hora de Criação: 26/04/2024 às 14:12:26

### Documentos que originaram esse envelope:

- 127ª Ata Defesa de Dissertação - Eniale de Melo Oliveira.doc (Documento Microsoft Word) - 1 página(s)
- Folha de Aprovação Defesa - Eniale de Melo Oliveira.doc (Documento Microsoft Word) - 1 página(s)
- Folha de Rosto Defesa Dissertação - Eniale de Melo Oliveira.doc (Documento Microsoft Word) - 1 página(s)



## Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: 5cf2577e7cc4cb25f258885961c429acbdb4e8636f7011e31a1a02d20e634299

[SHA512]: 9143fb0d9c466cd0493389b4377e4e7198ca92114c4270316ea7ac87a4db9e2fd0e8b6aa30e65fb35b058b31a30eff708485a1446450fa4cbfd8ab7a9a09e3da

## Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



### ASSINADO - Consuelo Domenici Roberto (consuelo.roberto@ufes.br)

Data/Hora: 26/04/2024 - 14:48:03, IP: 104.28.63.184

[SHA256]: 4243eced24a132d8bc587700fff282a10b934a9e0c123f1818dedecdc7c3df0f



### ASSINADO - Denes Kaic Alves do Rosário (deneskaic@gmail.com)

Data/Hora: 26/04/2024 - 21:24:40, IP: 179.109.147.50

[SHA256]: 7dd50752e3fcf2247f4c4d7b1a1bec3d77a2ee976ced8266519f82f77092704f



### ASSINADO - João Paulo Natalino de Sá (jpsadesa@academico.ufes.br)

Data/Hora: 26/04/2024 - 19:45:49, IP: 187.104.199.233, Geolocalização: [-10.993801, -37.054741]

[SHA256]: 4c1adeb046c68096049c864484f2ef5f58c634ce512dfa3321fab9b16a32bfbf



### ASSINADO - Patricia Campos Bernardes (patricia.bernardes@ufes.br)

Data/Hora: 26/04/2024 - 14:14:31, IP: 179.109.143.83, Geolocalização: [-20.756170, -41.531302]

[SHA256]: e8e91f0014cd894277d95ee2fcfedc36fcd0883d15b8be0c4854c37a86cc28e3



### ASSINADO - Sérgio Henriques Saraiva (sergio.saraiva@ufes.br)

Data/Hora: 28/04/2024 - 16:17:42, IP: 179.109.143.195, Geolocalização: [-20.755634, -41.531166]

[SHA256]: dda88398bbf17df9f1c87cde6930d48a368b0585b7b9d9c688d39a6fb82fedcc

## Histórico de eventos registrados neste envelope

- 28/04/2024 16:17:42 - Envelope finalizado por sergio.saraiva@ufes.br, IP 179.109.143.195
- 28/04/2024 16:17:42 - Assinatura realizada por sergio.saraiva@ufes.br, IP 179.109.143.195
- 28/04/2024 16:17:35 - Envelope visualizado por sergio.saraiva@ufes.br, IP 179.109.143.195
- 26/04/2024 21:24:40 - Assinatura realizada por deneskaic@gmail.com, IP 179.109.147.50
- 26/04/2024 21:24:20 - Envelope visualizado por deneskaic@gmail.com, IP 179.109.147.50
- 26/04/2024 19:45:49 - Assinatura realizada por jpsadesa@academico.ufes.br, IP 187.104.199.233
- 26/04/2024 19:45:31 - Envelope visualizado por jpsadesa@academico.ufes.br, IP 187.104.199.233
- 26/04/2024 14:48:03 - Assinatura realizada por consuelo.roberto@ufes.br, IP 104.28.63.184
- 26/04/2024 14:14:31 - Assinatura realizada por patricia.bernardes@ufes.br, IP 179.109.143.83
- 26/04/2024 14:14:04 - Envelope registrado na Blockchain por patricia.bernardes@ufes.br, IP 179.109.143.83
- 26/04/2024 14:14:03 - Envelope encaminhado para assinaturas por patricia.bernardes@ufes.br, IP 179.109.143.83
- 26/04/2024 14:12:39 - Envelope criado por patricia.bernardes@ufes.br, IP 179.109.143.83

Ao meu pai, Waldemar, aquele que sempre foi meu porto seguro. Palavras não são suficientes para expressar a profundidade do amor e gratidão que tenho pelo Senhor. Obrigado por ser meu guia, meu amigo e meu maior admirador.  
Lhe dedico essa dissertação.

## AGRADECIMENTOS

Inicio os meus agradecimentos àqueles que foram fundamentais nesta jornada, começando por expressar minha imensa gratidão a Deus, Ele foi luz que iluminou cada passo desta trajetória. Sua presença constante sustentou-me nos momentos mais desafiadores.

Ao meu amado pai, que é o maior amor da minha vida, dedico palavras de gratidão sem fim. Sua confiança em mim, seu amor incondicional, compreensão e apoio foram o alicerce sobre o qual construí cada conquista. Agradeço por sonhar meus sonhos junto comigo, por seus sacrifícios e dedicação para minha formação, pois este sonho que hoje realizo é também o seu. Aos meus irmãos, cujo apoio e incentivo foram constantes, expresso minha sincera gratidão. Sem o amor e suporte incondicionais de vocês, eu não seria quem sou hoje.

À minha mãe, por todo incentivo e preocupação diária.

À minha querida tia Cida, cujas orações foram meu sustento emocional, agradeço pelo apoio, compreensão e por ser um ombro amigo ao longo dessa jornada.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Campos Bernardes, expresso minha mais profunda gratidão por seu apoio, orientação precisa, confiança em meu potencial e palavras que me motivaram em cada etapa desta jornada acadêmica. Pelos momentos dentro e fora do ambiente de trabalho, por cada café mais que especial. Que nossa parceria continue no próximo desafio.

Ao Dr. Denes Kaic Alves do Rosário, meu coorientador, expresso minha sincera gratidão por seus ensinamentos e orientação, principalmente na estatística, os quais foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Sua parceria e apoio foram fundamentais para o sucesso desta empreitada acadêmica e espero que continue sendo nas demais que vierem. Obrigada pelos aprendizados não só na ciência, mas para vida.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Consuelo Domenici Roberto, minha coorientadora, agradeço por compartilhar seus ensinamentos.

A Maria Eduarda, pela ajuda e colaboração na fase experimental.

Ao Pedro, por ser um amigo dentro e fora do trabalho. Sua generosidade, disposição e carinho foram essenciais em cada etapa do experimento. Obrigada por tornar a rotina mais leve.

À Camila, minha companheira desde a graduação e de lar. Juntas compartilhamos não somente os sonhos acadêmicos, mas também a vida pessoal durante este período. Sua presença foi imprescindível para os meus desafios deste ciclo. Espero que tenhamos muito o que viver e compartilhar juntas.

Aos técnicos dos laboratórios e funcionários do PCTA, em especial Letícia, Maurício e Mayara, pela colaboração e convivência durante este período.

Aos professores do PCTA por todo o conhecimento que contribuíram para meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao Prof. Dr. Sérgio Henriques Saraiva pelo auxílio com a estatística e sua disponibilidade em me ajudar.

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PCTA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa, sem os quais esta conquista não seria possível.

Dentre os diversos desafios enfrentados ao longo deste mestrado, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para tornar esta jornada uma experiência única e enriquecedora. A todos vocês, minha mais sincera gratidão. Que possamos continuar compartilhando conquistas e desafios juntos no futuro.

Meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Referências bibliográficas .....	3
2. OBJETIVOS .....	5
2.1. Geral.....	5
2.2. Específicos .....	5
3. ARTIGO ORIGINAL 1 .....	6
DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTIVO LABORATORIAL PARA SIMULAR LOMBO BRASILEIRO CURADO A SECO .....	6
4. ARTIGO ORIGINAL 2 .....	21
MODELAGEM DO EFEITO COMBINADO DE ATIVIDADE DE ÁGUA, CLORETO DE SÓDIO E TEMPERATURA EM SISTEMA MODELO SOCOL: COMPORTAMENTO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> E INATIVAÇÃO EM FLUIDO GÁSTRICO SIMULADO .....	21
5. CONCLUSÃO .....	52

## RESUMO

OLIVEIRA, Eniale de Melo. **Modelagem do efeito combinado de atividade de água, cloreto de sódio e temperatura em sistema modelo Socol: comportamento de *Listeria monocytogenes* e inativação em fluido gástrico simulado.** 2024. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Patrícia Campos Bernardes. Coorientador(es): Prof<sup>ª</sup>. Dra. Consuelo Domenici Roberto e Dr. Denes Kaic Alves do Rosário.

Este estudo avaliou a influência dos fatores atividade de água ( $A_w$ ), cloreto de sódio (NaCl) e temperatura (T) na multiplicação/sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em um sistema modelo a base de lombo suíno curado a seco, denominado Socol. O objetivo principal foi desenvolver modelos matemáticos para ajustar a atividade de água em um sistema modelo baseado em Socol (SMS) e investigar os efeitos desses fatores na sobrevivência de *L. monocytogenes*, um patógeno de alto risco, nas condições que envolvem a produção do Socol. Para isso, foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e, feita a validação dos modelos obtidos. O comportamento de *L. monocytogenes* em diferentes condições de  $A_w$  (0,806 – 0,974), temperatura (0,9 – 31,1°C) e concentração de cloreto de sódio (1,97 – 9,53% (p/p)) foi estudado. Os modelos desenvolvidos apresentaram qualidade de ajuste satisfatória aos dados de acordo com os índices estudados: falta de ajuste ( $p > 0,05$ ), coeficiente de determinação ( $R^2 \geq 0,96$ ), fator de precisão ( $A_f$ ) do modelo e o fator de viés ( $B_f$ ), fornecendo uma ferramenta eficaz para simular as condições encontradas no Socol. A atividade de água foi o fator mais influente no crescimento e sobrevivência de *L. monocytogenes*, seguida pelo NaCl. A bactéria teve seu crescimento pronunciado em maiores valores de  $A_w$  ( $>0,92$ ) e menores concentrações de NaCl ( $<6\%$ ). Com o decorrer do tempo a temperatura passou a ser não significativa na multiplicação do patógeno. Apesar de *L. monocytogenes* ter sido inativada em todas as condições testadas no fluido gástrico, o estudo revelou uma preocupação com a sobrevivência desse patógeno durante a sua produção e no produto, especialmente em temperaturas mais baixas. É necessária atenção à possibilidade de adotar a refrigeração na cadeia produtiva do Socol, não sendo o adequado de acordo com os resultados obtidos. Reforça-se ainda, além da necessidade do controle das variáveis estudadas, o uso de matéria-prima de boa qualidade, a implementação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e os cuidados higiênicos durante a produção do Socol.

**Palavras-chave:** Cura a seco, Delineamento Composto Central Rotacional, Modelagem matemática, Segurança de alimentos, Superfície de resposta.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Eniale de Melo. **Modeling the combined effect of water activity, sodium chloride, and temperature in a Socol model system: *Listeria monocytogenes* behavior and inactivation in simulated gastric fluid**. 2024. Dissertation (Master's in Food Science and Technology) – Federal University of Espírito Santo, Alegre – ES. Advisor: Prof. Dsc. Patrícia Campos Bernardes. Co-advisors: Prof. Dsc. Consuelo Domenici Roberto and Dsc. Denes Kaic Alves do Rosário.

This study evaluated the influence of water activity ( $A_w$ ), sodium chloride (NaCl), and temperature (T) on the multiplication/survival of *Listeria monocytogenes* in a model system based on dry-cured pork loin, called Socol. The main objective was to develop mathematical models to adjust water activity in a Socol-based model system (SMS) and investigate the effects of these factors on the survival of *L. monocytogenes*, a high-risk pathogen, under conditions typical of Socol production. The Rotational Central Composite Design (DCCR) was used, and the obtained models were validated. The behavior of *L. monocytogenes* under different conditions of  $A_w$  (0.806 – 0.974), temperature (0.9 – 31.1°C), and sodium chloride concentration (1.97 – 9.53% (w/w)) was studied. The models developed presented satisfactory fit to the data according to the indices studied: lack of fit ( $p > 0.05$ ), coefficient of determination ( $R^2 \geq 0.96$ ), precision factor ( $A_f$ ), and bias factor ( $B_f$ ), providing an effective tool to simulate the conditions found in Socol. Water activity was the most influential factor on the growth and survival of *L. monocytogenes*, followed by NaCl. The bacteria's growth was pronounced at higher  $A_w$  values ( $> 0.92$ ) and lower NaCl concentrations ( $< 6\%$ ). Over time, temperature became insignificant. Although *L. monocytogenes* was inactivated under all conditions tested in gastric fluid, the study revealed concerns about the survival of this pathogen during production and in the product, especially at lower temperatures. It is necessary to consider adopting refrigeration in the Socol production chain, as this is not appropriate according to the results obtained. Furthermore, in addition to controlling the measured variables, the use of good quality raw materials, the implementation of Good Manufacturing Practices (GMP), and hygienic care during the production of Socol are reinforced.

**Keywords:** Dry cured, Rotational Central Composite Design, Mathematical modeling, Food safety, Response surface.

## 1. INTRODUÇÃO

Os embutidos cárneos desempenham um papel significativo na culinária brasileira e global, sendo a carne suína uma das principais protagonistas nesse cenário. Além disso, os mesmos são fontes proteicas de grande importância e alcance econômico a várias classes. No Brasil, especificamente na cidade de Venda Nova do Imigrante, Espírito Santo, é produzido um lombo suíno curado a seco, denominado Socol (ARAUJO, 2021; FREITAS et al., 2021). O município de Venda Nova do Imigrante possui Indicação Geográfica (IG), na categoria de indicação de procedência (IP) do mesmo (INPI, 2018) e sua produção está intimamente ligada ao desenvolvimento do agroturismo da região. A produção do Socol envolve a salga, a condimentação com alho e pimenta preta, embutimento e maturação, importante para garantir não só as características sensoriais únicas do produto, mas também para reduzir a atividade de água, fator crucial para sua conservação (ARAUJO, 2021; FREITAS et al., 2021).

No entanto, o estudo do Socol e de outros embutidos cárneos não está isenta de desafios. A complexidade de matrizes alimentares, aliada ao estudo de patógenos, como *Listeria monocytogenes*, torna a reprodução laboratorial das reais condições do produto uma tarefa desafiadora. Isso pode comprometer a eficácia das pesquisas destinadas a entender e mitigar os riscos associados a esses produtos (CAPUANO; OLIVIERO; VAN BOEKEL, 2018; HAN et al., 2021; KOGO; KUMAR; KOECH, 2021). Uma estratégia para contornar esses obstáculos é o uso de sistemas modelo alimentares, que torna possível e facilita os estudos, controlando as propriedades específicas e desejadas do alimento (GERLAI, 2003; MILEA et al., 2020).

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogênica, psicrotrófica, amplamente distribuída na natureza e responsável pela listeriose, uma doença com alta taxa de mortalidade em pessoas suscetíveis (LAKICEVIC; DEN BESTEN; DE BIASE, 2022; WANG et al., 2021). Este patógeno pode crescer sob condições desafiadoras, como baixo pH, baixas temperaturas e altas concentrações de sal, apresentando alto potencial de virulência, adaptação ambiental e mecanismos de resposta a estresses. É um dos principais alvos em produtos prontos para consumo, que não passam por aquecimento e requerem uma atenção especial quanto a este patógeno (LAKICEVIC; DEN BESTEN; DE BIASE, 2022).

*L. monocytogenes* tem sido encontrada em ambientes de processamento de carnes (D'ARRIGO et al., 2020; SCHÄFER et al., 2017), alertando para uma possível contaminação ao longo das etapas de fabricação. Na produção do Socol essa contaminação poderia ocorrer desde a obtenção da matéria-prima até as etapas subsequentes à produção. Algumas dessas etapas são potenciais pontos de contaminação, como a recepção da matéria-prima, a salga, que em certos casos ocorre sob refrigeração, o preparo das peças para maturação devido à manipulação ou utilização de utensílios contaminados e, a lavagem que aumenta a atividade de água, intensificando o risco de multiplicação microbiana (FREITAS et al., 2021).

Porém, os produtos cárneos curados, de uma forma geral, proporcionam um ambiente hostil para microrganismos devido suas características, como o elevado teor de sal e baixa atividade de água, que em geral resultam em condições estressantes que podem comprometer a viabilidade dos microrganismos (MUTZ et al., 2019). No entanto, *L. monocytogenes* demonstra uma notável capacidade de resistência a diversos estresses químicos e físicos para sobreviver e se propagar dentro e fora do hospedeiro, incluindo a capacidade de crescer e sobreviver em temperaturas de refrigeração e de resistir a condições de estresse osmótico e ácido (CHIHIB et al., 2003; NALBONE et al., 2024). Tais adaptações podem resultar em maior capacidade de sobrevivência e patogenicidade durante a passagem pelo trato gastrointestinal humano (ALVES et al., 2020; DIKICI; CALICIOGLU, 2013; MUTZ et al., 2019).

Dada a escassez de estudos sobre o Socol, sua microbiota e os potenciais danos à saúde humana, torna-se ainda mais evidente a necessidade de pesquisas aprofundadas para compreender e minimizar os riscos associados a esse produto. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um sistema modelo de Socol (SMS) e ajustar a atividade de água, utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional. Posteriormente, buscou-se avaliar os efeitos combinados do cloreto de sódio, atividade de água e temperatura no comportamento de *L. monocytogenes*, incluindo sua sobrevivência ao fluido gástrico simulado após exposição a diferentes condições no SMS.

## 1.1. Referências bibliográficas

ALVES, Â. et al. Impact of exposure to cold and cold-osmotic stresses on virulence-associated characteristics of *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**, v. 87, p. 103351, 1 maio 2020.

ARAUJO, G. Z. **CONSERVAÇÃO DE SOCOL COM APLICAÇÃO DE EXTRATO ALCOÓLICO DE CRAVO-DA ÍNDIA, ALHO E PIMENTA-DO-REINO**. Monografia (Bacharelado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)—Venda Nova do Imigrante: Instituto Federal do Espírito Santo, 2021.

CAPUANO, E.; OLIVIERO, T.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. **Modeling food matrix effects on chemical reactivity: Challenges and perspectives**. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2018.

CHIHIB, N. E. et al. Different cellular fatty acid pattern behaviours of two strains of *Listeria monocytogenes* Scott A and CNL 895807 under different temperature and salinity conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 218, n. 1, 2003.

D'ARRIGO, M. et al. Characterization of persistent *Listeria monocytogenes* strains from ten dry-cured ham processing facilities. **Food Microbiology**, v. 92, p. 103581, 1 dez. 2020.

DIKICI, A.; CALICIOGLU, M. Survival of *Listeria monocytogenes* during production and ripening of traditional Turkish Savak Tulum cheese and in synthetic gastric fluid. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 10, 2013.

FREITAS, J. F. DE et al. SOCOL: A INDICAÇÃO GEOGRÁFICA COMO PROMOTORA DE AVANÇOS NA LEGISLAÇÃO SANITÁRIA. **Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural**, v. 11, n. 12, p. 38–48, 2021.

GERLAI, R. **Zebra fish: An uncharted behavior genetic model**. *Behavior Genetics*. **Anais...**2003.

HAN, J. W. et al. A comprehensive review of cold chain logistics for fresh agricultural products: Current status, challenges, and future trends. **Trends in Food Science and Technology**, 2021.

INPI, I. N. D. P. I. Indicações Geográficas. **Revista da Propriedade Industrial**, v. 2475, n. IV, 12 jul. 2018.

KOGO, B. K.; KUMAR, L.; KOECH, R. Climate change and variability in Kenya: a review of impacts on agriculture and food security. **Environment, Development and Sustainability**, 2021.

LAKICEVIC, B. Z.; DEN BESTEN, H. M. W.; DE BIASE, D. Landscape of Stress Response and Virulence Genes Among *Listeria monocytogenes* Strains. **Frontiers in Microbiology**, 2022.

MILEA, Ş. A. et al. Combination of freeze drying and molecular inclusion techniques improves the bioaccessibility of microencapsulated anthocyanins from black rice

(*Oryza sativa* L.) and lavender (*Lavandula angustifolia* L.) essential oils in a model food system. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 12, 2020.

MUTZ, Y. S. et al. Prior exposure to dry-cured meat promotes resistance to simulated gastric fluid in salmonella typhimurium. **Foods**, v. 8, n. 12, 2019.

NALBONE, L. et al. A stochastic approach for modelling the in-vitro effect of osmotic stress on growth dynamics and persistent cell formation in *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 413, p. 110586, 2 mar. 2024.

SCHÄFER, D. F. et al. Monitoring of contamination sources of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse. **LWT**, v. 86, 2017.

WANG, Y. et al. Prevalence and Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolated From Retail Pork in Wuhan, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Elaborar um sistema modelo de Socol (SMS), ajustar sua atividade de água e, avaliar o efeito combinado de fatores intrínsecos e extrínsecos (atividade de água ( $A_w$ ), temperatura (T) e cloreto de sódio (NaCl)) utilizados na produção do Socol, na multiplicação/sobrevivência de *Listeria monocytogenes*. Posteriormente, verificar se a exposição a essas condições favorecem à sua sobrevivência em fluido gástrico simulado.

### 2.2. Específicos

- a. Elaborar e validar o sistema modelo a base de Socol variando-se as concentrações de cloreto de sódio e glicerol por meio de um modelo matemático para ajuste de atividade de água;
- b. Avaliar a multiplicação/sobrevivência de *L. monocytogenes* em diferentes valores de atividade de água, temperatura e cloreto de sódio no sistema modelo a base de Socol desenvolvido;
- c. Avaliar a sobrevivência em fluido gástrico simulado de células de *L. monocytogenes* previamente expostas às condições do sistema modelo;
- d. Avaliar o efeito do estresse osmótico e do estresse causado pelo frio em *L. monocytogenes* na cadeia produtiva do Socol.
- e. Avaliar se *L. monocytogenes* é inativada nas condições atuais de produção do Socol.

### 3. ARTIGO ORIGINAL 1

## DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTIVO LABORATORIAL PARA SIMULAR UM PRODUTO CÁRNEO CURADO A SECO

Eniale de Melo Oliveira<sup>1</sup>, Maria Eduarda Nascimento de Jesus<sup>1</sup>, Pedro Henrique Alves Martins<sup>1</sup>, Consuelo Domenici Roberto<sup>1</sup>, Denes Kaic Alves do Rosário<sup>1</sup>, Patrícia Campos Bernardes<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de alimentos,  
Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre - ES, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias e  
Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre - ES, Brasil

\*autor correspondente: [patricia.bernardes@ufes.br](mailto:patricia.bernardes@ufes.br)

**RESUMO:** Investigar fatores intrínsecos, como a atividade de água, em determinados alimentos é um desafio devido a ampla faixa deste fator, por exemplo, durante o processamento. Em produtos cárneos curados e maturados, o amplo nível de atividade de água e diferentes teores de NaCl são uma barreira para estudos microbiológicos profundos e controlados *in situ*. Portanto, o objetivo foi desenvolver um meio de cultivo laboratorial para simular um produto cárneo curado a seco. Foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para ajustar a atividade de água por meio da adição de cloreto de sódio (0,76 - 9,24 % (p/p)) e glicerol (0,34 à 52,24 % (p/p)). O modelo matemático ajustado apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,99, tendo a normalidade do resíduo verificada, pelo teste de Shapiro-Wilk. Os coeficientes de validação experimental como, o fator de precisão ( $A_f$ ) (1,01) do modelo, o fator de viés ( $B_f$ ) (0,99) e o erro quadrático médio (MSE) (<0,0001) foram satisfatórios. Dentro do intervalo estudado, o efeito do glicerol superou o efeito do NaCl, devido às suas fortes interações com a água. O modelo ajustado foi capaz de descrever com eficiência a atividade de água em função das concentrações de cloreto de sódio e glicerol em um produto cárneo curado a seco, utilizando o sistema modelo. Desta forma, o sistema modelo desenvolvido pode ser utilizado para simular um produto cárneo curado a seco e maturado em estudos envolvendo qualidade e segurança dos alimentos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Carne curada a seco e maturada. Delineamento composto central. Atividade de água. Cloreto de sódio. Sistema modelo cárneo.

## 1. INTRODUÇÃO

Os alimentos são produtos de composição complexa e extremamente variável. Essa complexidade dificulta a reprodução laboratorial em estudos aprofundados de diversos fatores intrínsecos. Estes fatores podem estar relacionados à produção, conservação, qualidade e segurança do alimento (Capuano; Oliviero; Van Boekel, 2018; Yu et al., 2021; Zareef et al., 2020). Desta forma, trabalhar diretamente com as condições reais de produção do alimento apresenta uma série de desafios. Diversas questões prejudicam a qualidade e a eficácia da pesquisa na área de alimentos tais como a variabilidade sazonal, custos elevados de experimentação, dificuldades em manter um controle experimental rigoroso e fatores intrínsecos associados (Han et al., 2021; Kogo; Kumar; Koech, 2021).

Uma alternativa para superar esses obstáculos é o uso de sistemas modelo alimentar, que torna possível o controle de propriedades específicas de um alimento ou processo (GERLAI, 2003; MILEA et al., 2020). Este método de estudo simula as condições reais do alimento, oferecendo vantagens significativas (MATHEW et al., 2020). Fatores como a atividade de água, pH, teor de sal, composição da matéria-prima, entre outros, são elementos que desempenham um papel crucial na qualidade, segurança e propriedades nutricionais dos produtos alimentares. No entanto, é importante considerar que as condições nos quais muitos alimentos são produzidos e armazenados podem apresentar limitações na investigação desses fatores (Harper; Hewitt; Huffman, 2019; Rodríguez et al., 2014; Smet et al., 2016).

Um exemplo relevante nesse contexto são as carnes curadas a seco e maturadas, produzidas através da difusão de sal de cura pela superfície da carne sem adição de água, seguido da maturação que pode durar meses ou anos, dependendo do tempo necessário para atingir a atividade de água desejada (Mutz et al., 2020; Toldrá, 2004). Esses produtos, que incluem uma variedade de presuntos, salames e produtos similares, são apreciados por seu sabor distinto e perfil de maturação. No entanto, a compreensão completa dos fatores que influenciam a qualidade das carnes curadas requer investigações desenvolvidas em ambientes controlados. Estudar a interação entre ingredientes, microrganismos e condições de cura utilizando sistemas modelo é adequado para aprimorar a produção e a qualidade desses produtos, garantindo sua segurança (Alia et al., 2019; Wakamatsu et al., 2004).

A atividade de água e a concentração de cloreto de sódio desempenham um papel crucial na produção de carnes curadas a seco e no produto, do ponto de vista microbiológico. O NaCl, desde a antiguidade, é adicionado à alimentos como forma de conservação. Os íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> podem afetar a membrana e os sistemas citosólicos dos microrganismos, acima de um certo limite, causando estresse iônico. Além disso, causam um estresse osmótico à medida que aumenta sua concentração e, reduz a atividade de água do meio, levando ao efluxo de água da célula, afetando seu volume, turgor e atividades metabólicas (Bois et al., 2006; Scott, 1957; Van Long et al., 2017). O glicerol é comumente utilizado como soluto higroscópico em meios de cultura porque é não iônico e tem, portanto, um efeito limitado no desenvolvimento de bactérias, não causando plasmólise, à medida que NaCl causa (Mattick et al., 2000; Van Long et al., 2017).

Os produtos cárneos curados são amplamente reconhecidos como produtos microbiologicamente estáveis, devido à baixa atividade de água, além da concentração de sal e a presença de diversos ingredientes em sua formulação. Entretanto, em diferentes etapas de produção podem ocorrer a multiplicação/sobrevivência de microrganismos, sejam eles benéficos, deterioradores e/ou patogênicos (Cava; Higuero; Ladero, 2021; Freitas et al., 2021). Estes fatores ocorrem em vários níveis e atuam simultaneamente. Desta forma, é necessário a utilização de um desenho experimental que atua quantitativamente em diferentes níveis das variáveis, como o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), um dos possíveis delineamentos que pode ser usado para ajustar modelos quadráticos para as variáveis resposta, sendo, portanto, bastante útil em processos de otimização, além de possibilitar um número reduzido de experimentos (Hill; Hunter, 1966; Yolmeh; Jafari, 2017).

Portanto, este estudo objetivou obter um modelo que estime a atividade de água de um sistema modelo que simula um lombo curado a seco e maturado produzido no Brasil, usando NaCl e glicerol como variáveis de ajuste.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Preparo da amostra**

As amostras de lombo curado a seco e maturado (Socol) foram adquiridas de quatro diferentes produtores no município de Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil (latitude 20°19'31,9"S e longitude 41°07'56,6"W). Foram obtidas três peças de cada produtor, totalizando doze peças de Socol. As peças foram produzidas durante o inverno (jun.–set./21) e verão (dez/21–mar/22) com condições de maturação de temperatura ambiente. Em média, a temperatura ambiente durante o período de coleta, no inverno foi de 17°C e no verão 22°C (Instituto Nacional de Meteorologia, 2023). Após a coleta, as amostras foram embaladas a vácuo e transportadas ao laboratório, também em temperatura ambiente, e armazenadas em freezer vertical (-20 °C) até o momento da análise.

Para preparar o sistema modelo, as amostras foram trituradas, desidratadas em liofilizador (JJ Científica®, LJW - EUA). Após a desidratação, as amostras foram novamente trituradas, utilizando liquidificador (Power mix, Arno, 550W), acondicionadas em sacos transparentes de polietileno e, seladas à vácuo utilizando a seladora NS400B (China).

O sistema modelo a base de Socol (SMS) foi preparado de acordo com método descrito por Rodríguez et al., (2014), com algumas modificações. Foram fixados os valores de 2% (p/p) ágar e 3% (p/p) de Socol liofilizado. De acordo com os ensaios gerados (Tabela 1), foram adicionadas as quantidades propostas pelo DCCR de NaCl e glicerol, para ajuste da atividade de água. Os ingredientes foram pesados e adicionados na seguinte ordem: Socol liofilizado, cloreto de sódio, ágar, glicerol e água, até atingir 100% (p/p), para adequada homogeneização. O sistema foi fechado e aquecido em agitador magnético HJ-10 (Satra, Brasil) até a ebulição. Em seguida, o ágar SMS foi resfriado, sendo o aquecimento repetido mais uma vez.

O aquecimento consecutivo e gradual foi importante devido à redução parcial da coagulação proteica, já que o aquecimento rápido e intenso pode causar coagulação excessiva (Tornberg, 2005). Após aquecimento, o ágar SMS foi autoclavado à 120 °C por 20 minutos e, em seguida, vertido em placas de Petri para análise posterior de atividade de água (Aw) (LabMaster-aw, Novasina, Suíça) em triplicata.

## **2.2. Desenho experimental**

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi utilizado com um desenho experimental  $2^2$ , em que foram realizados 10 ensaios de forma aleatória, com duas repetições no ponto central, para avaliar os efeitos do glicerol e NaCl na atividade de água do sistema modelo (Tabela 1). As duas repetições no ponto central foram realizadas para avaliar o erro experimental e, portanto, a falta de ajuste do modelo. Para análise dos dados foi utilizado o software Statistica 12<sup>®</sup>.

O intervalo das concentrações de NaCl foi definido considerando a concentração de cloretos encontrada nas amostras de Socol adquiridas (4-8 % (p/p) de cloretos). A análise de cloretos foi feita conforme descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). O intervalo das concentrações de glicerol foi definido considerando testes preliminares com as peças de Socol obtidas obtendo  $A_w$  variando de 0,80-0,98 (dados não publicados).

Tabela 1. Variáveis independentes (fatores) codificadas e não codificadas conforme o delineamento composto central rotacional.

Fatores	Níveis				
	-1,4242	-1	0	+1	+1,4142
<b>NaCl</b>	0,76	2,00	5,00	8,00	9,24
<b>G</b>	0,34	8,00	26,50	45,00	52,66

NaCl: concentração de cloreto de sódio (%); G: glicerol (%).

### 2.3. Modelagem matemática

Para obter a equação polinomial (Equação 1) que descreve o efeito das variáveis independentes (NaCl e glicerol) na atividade de água do sistema modelo, foi realizada a análise de regressão múltipla usando o software Statistica 12<sup>®</sup>. Para verificar a normalidade dos resíduos dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para apresentar graficamente a equação obtida. Para descrever a proporção da variação explicada pelo nível das variáveis independentes do modelo, foi calculado o valor de  $R^2$  e o obtido e, o valor do erro quadrado médio (MSE).

$$A_w = B_0 + \sum_{i=1}^3 B_i X_i + \sum_{i=1}^3 B_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j>i}^3 B_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

Em que: X é a variável (NaCl ou glicerol), B é o coeficiente de regressão e  $\varepsilon$  é o erro experimental.

Para avaliar a zona de predição aceitável da equação, o erro relativo (ER) foi calculado conforme a Equação (2) (Delignette-Muller et al., 1995).

$$ER = \frac{Aw_{observed} - Aw_{fitted}}{Aw_{fitted}} \quad (2)$$

## 2.4. Validação do modelo

A validação da equação foi realizada sob condições experimentais adicionais aleatórias que não foram utilizadas na sua construção. Estas condições adicionais contaram com 6 ensaios, os valores de NaCl foram: 1; 7,50; 4,0; 3,0; 6,0; 4. Em conjunto com valores de Glicerol: 1,0; 15; 30; 20; 40; 10, respectivamente.

Para avaliar os fatores de precisão ( $A_f$ ) e de viés ( $B_f$ ) do modelo, foram utilizadas estas condições experimentais acima, através das Equações 3 e 4, respectivamente, de acordo com Baranyi et al. (1999). O fator de precisão ( $A_f$ ) mede a dispersão dos dados observados em relação aos ajustados pelo modelo. Enquanto o fator de viés ( $B_f$ ) indica o grau de concordância entre os valores observados e ajustados. Seguindo as recomendações de Ross et al. (2000) é desejável que esses dois fatores apresentem valores próximos de um.

$$A_f = \exp\left(\sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m (\ln f(x^{(k)}) - \ln \mu^{(k)})^2}{m}}\right) \quad (3)$$

$$B_f = \exp\left(\sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m (\ln f(x^{(k)}) - \ln \mu^{(k)})}{m}}\right) \quad (4)$$

Em que:  $\ln f(x)$  é o valor predito pelo modelo,  $\ln \mu$  é o valor observado e  $m$  o número de experimentos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Modelo matemático e desempenho

Os 10 ensaios realizados, bem como a atividade de água observada em cada um deles, estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade de água e desvio padrão do sistema modelo de Socol (SMS) após ajuste dos níveis de cloreto de sódio e glicerol de acordo com o delineamento composto central rotacional.

Ensaio	NaCl (% p/p)	Glicerol (% p/p)	Aw*
1	2,00	8,00	0,979 ± 0,001
2	2,00	45,00	0,782 ± 0,001
3	8,00	8,00	0,926 ± 0,002
4	8,00	45,00	0,684 ± 0,003
5	0,76	26,50	0,922 ± 0,001
6	9,24	26,50	0,806 ± 0,003
7	5,00	0,34	0,976 ± 0,004
8	5,00	52,24	0,671 ± 0,002
9	5,00	26,50	0,859 ± 0,003
10	5,00	26,50	0,860 ± 0,001

NaCl: concentração de cloreto de sódio (%); G: glicerol (%); \*Aw: atividade de água (média e desvio padrão de três repetições).

O polinômio (Equação 5) que descreve o efeito do NaCl e glicerol na atividade de água do sistema modelo de Socol foi obtido por meio de uma análise de regressão múltipla que considerou efeitos lineares, quadráticos e de interação.

$$Aw = 1,0104 - 0,0086 \cdot NaCl - 0,0001 \cdot NaCl^2 - 0,0015 \cdot G - 0,00006 \cdot G^2 - 0,0002 \cdot NaCl \cdot G \quad (5)$$

Em que,  $Aw$  é atividade de água e  $G$  é glicerol.

Os valores residuais apresentaram distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk, pois o valor  $p$  foi de 0,1701. Como  $p \geq 0,05$  então a hipótese de nulidade é aceita (GRANATO; DE ARAÚJO CALADO; JARVIS, 2014). O valor de falta de ajuste foi não significativo ( $P = 0,821$ ) indicando assim que o que modelo não foi capaz de explicar é estatisticamente igual ao erro puro, os desvios em relação ao modelo podem ser considerados aleatórios. O valor do coeficiente de determinação

( $R^2$ ) obtido nesse estudo foi igual a 0,99, bem próximo a um (Figura 1), o que indica um bom ajuste do modelo aos dados.

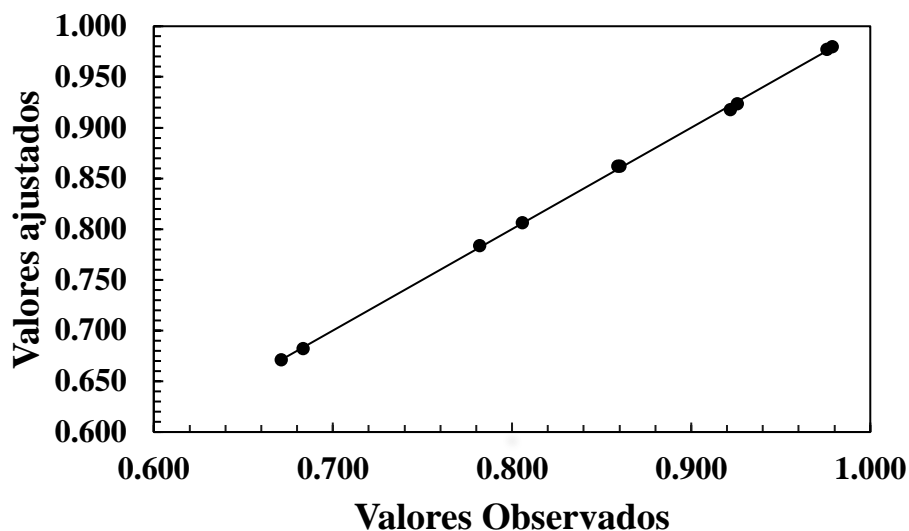


Figura 1: Valores ajustados *versus* valores observados da atividade de água do sistema modelo de Socol após ajuste dos níveis de cloreto de sódio e glicerol de acordo com o delineamento composto central rotacional.

Em relação ao erro relativo (ER), modelos que apresentam 70% das respostas corretas dentro da zona de previsão aceitável, tendem a ter bons valores dos fatores de viés e de precisão. Uma proporção de ER (PER) maior que 0,7 é considerada ideal. PER é calculado como o número de execuções com erro relativo dentro da zona de previsão aceitável dividido pelo número total de execuções. A zona de previsão aceitável compreende o erro relativo entre -0,3 (considerado seguro) e 0,15 (considerado arriscado) (Oscar, 2005). No presente estudo, o valor de PER foi igual a um, indicando que nenhuma das previsões ficou fora da zona de previsão aceitável (Figura 2).

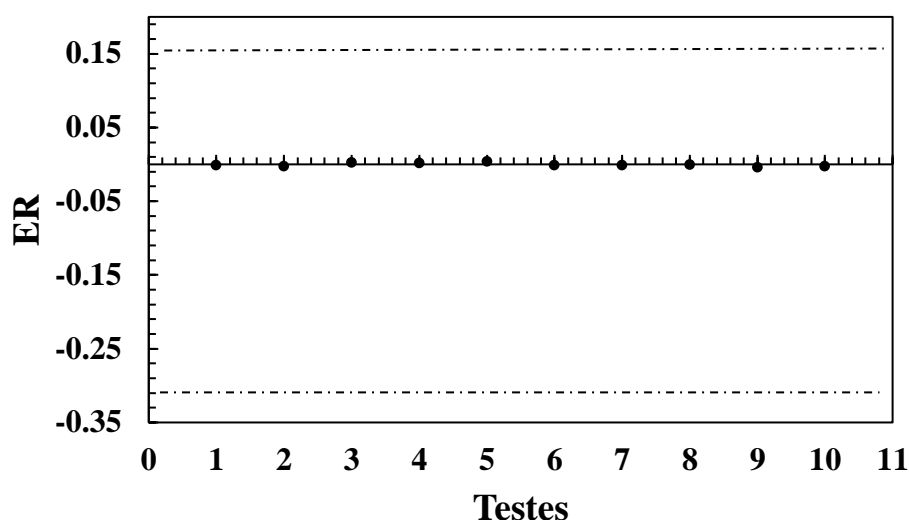


Figura 2: Erro relativo (ER) da atividade de água do sistema modelo de Socol após ajuste dos níveis de cloreto de sódio e glicerol de acordo com o delineamento composto central rotacional. Zona de predição aceitável de  $-0,3$  (fail-safe) e  $0,15$  (fail-dangerous).

Para avaliar o desempenho de modelos preditivos, o fator de viés ( $B_f$ ) e o fator de precisão ( $A_f$ ) são utilizados. Estes, foram calculados utilizando o conjunto de dados da validação (Tabela 3).

Tabela 3. Condições experimentais adicionais para validação do modelo preditivo de atividade de água em sistema modelo de Socol.

Testes	Variáveis Independentes		Aw	
	NaCl (%)	Glicerol (%)	Observado	Previsto
1	1,00	1,00	$0,991 \pm 0,005$	1,007
2	7,50	15,00	$0,883 \pm 0,001$	0,895
3	4,00	30,00	$0,857 \pm 0,001$	0,855
4	3,00	20,00	$0,919 \pm 0,010$	0,922
5	6,00	40,00	$0,771 \pm 0,002$	0,756
6	4,00	10,00	$0,957 \pm 0,002$	0,954

NaCl: concentração de cloreto de sódio (%); G: glicerol (%); Aw: atividade de água (média e desvio padrão de três repetições).

$B_f$  é usado para calcular se, em média, os valores observados estão acima ou abaixo da linha de equivalência considerando seus sinais positivos ou negativos. Assim, este fator avalia se o modelo é "fail-dangerous" ou "fail-safe". Quando há concordância perfeita entre os valores ajustados e observados, o valor do fator de viés é igual a 1 (Ross, 1996). Neste estudo, foi encontrado o valor de 0,99 para o fator de viés, que indica que o modelo encontrado não superestima o valor de atividade de água nas condições desejadas. Embora o modelo seja classificado como falha perigosa de acordo com a classificação de Ross (1996), foi encontrada uma concordância quase perfeita entre as previsões da equação e as observações experimentais.

Já o  $A_f$  calcula, em média, considerando a soma das distâncias entre os valores observados e a linha de equivalência e, pode ser usado como uma medida do nível de confiança nas previsões do modelo. Quanto maior o valor de  $A_f$  menos precisa é a estimativa média do modelo (Ross, 1996). Assim como o fator de viés, o valor de  $A_f$  igual a um indica concordância perfeita entre os dados ajustados e observados e, nesse estudo, para esse fator foi encontrado o valor de 1,01.

Em conjunto, os índices encontrados evidenciam que o modelo ajustado apresenta ótima qualidade de ajuste aos dados, sendo um modelo de alto desempenho que prevê satisfatoriamente valores de atividade de água utilizando NaCl e glicerol como solutos.

### **3.2. Efeito da adição de cloreto de sódio e glicerol na atividade de água do sistema modelo Socol**

A atividade de água é um parâmetro importante que indica a disponibilidade de água para as reações químicas e processos biológicos. A adição de compostos como o glicerol e o cloreto de sódio a uma solução aquosa pode reduzir a atividade de água, mas os mecanismos envolvidos são diferentes.

A Figura 3, diagrama de Pareto, demonstra os efeitos padronizados das variáveis estudadas sobre a  $A_w$ . A superfície de resposta (Figura 4) representa a equação que descreve o efeito do glicerol e cloreto de sódio na atividade de água do sistema modelo. De acordo com os efeitos padronizados apresentados (Figura 3) é possível comparar o efeito das diferentes variáveis no modelo. Ainda que o NaCl e o glicerol reduzam a atividade de água, conforme demonstrado, a variável de maior

impacto dentro do intervalo estudado nessa redução, é o glicerol. O mesmo é observado na Figura 4. Dentro da região experimental avaliada, ocorre uma maior variação da atividade de água quando ao longo do eixo do glicerol quando comparado ao longo do eixo do NaCl.

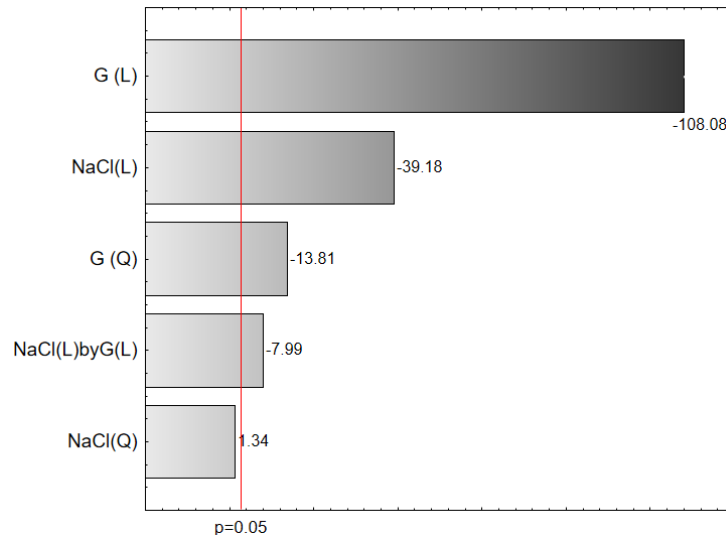


Figura 3: Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para variável atividade de água. L: termo linear; Q: termo quadrático.

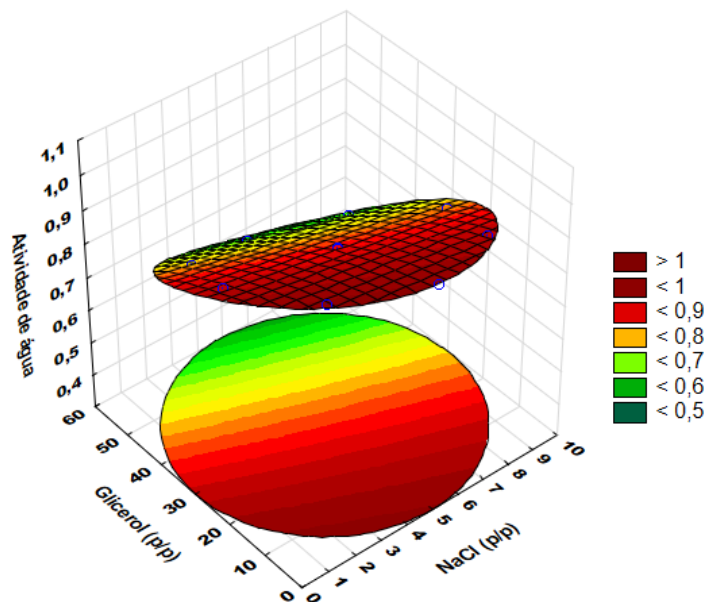


Figura 4: Superfície de resposta da atividade de água do sistema modelo variando concentrações de glicerol e cloreto de sódio (NaCl).

O glicerol possui três grupos hidroxilas (-OH) que vão formar ligações de hidrogênios com as moléculas de água, uma ligação forte que estabiliza a interação entre glicerol e água (Egorov; Lyubartsev; Laaksonen, 2011). Já o cloreto de sódio se

dissocia e durante a dissociação ocorrem interações iônicas com as moléculas de água, através da força íon-dipolo. Essa força não é direcional, como as ligações de hidrogênio, e neste caso, a força íon-dipolo entre os íons salinos e a água é mais fraca em comparação com a interação entre o glicerol e a água. Isso pode resultar em uma maior disponibilidade de água livre para reações (Brown et al., 2017; Damodaran e Parkin, 2019).

#### 4. CONCLUSÃO

Através do modelo matemático obtido é possível estimar a atividade de água, utilizando NaCl e Glicerol de um produto cárneo curado a seco e maturado, produzido considerando as condições de produção do Socol da região de Venda Nova do Imigrante/ES. Através da validação experimental, o modelo demonstrou ser preciso. Este fornece previsões confiáveis para a atividade de água em função das concentrações de glicerol e NaCl, com um ajuste adequado aos dados. Demonstrou ainda, que dentro do intervalo estudado, o glicerol exerce maior influência na redução da atividade de água, devido às suas fortes interações com a água. Outro ponto a ser ressaltado é que a utilização do sistema modelo desenvolvido proporcionou manuseio laboratorial para o estudo da influência do glicerol e cloreto de sódio, na atividade de água e estudos *in situ* que representam o Socol.

#### REFERÊNCIAS

- ALÍA, A. et al. Combined effect of temperature, water activity and salt content on the growth and gene expression of *Listeria monocytogenes* in a dry-cured ham model system. **Meat Science**, v. 155, 2019.
- BARANYI, J.; PIN, C.; ROSS, T. Validating and comparing predictive models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48, n. 3, 1999.
- BOIS, G.; BERTRAND, A.; PICHÉ, Y.; FUNG, M.; KHASA, D. P. Growth, compatible solute and salt accumulation of five mycorrhizal fungal species grown over a range of NaCl concentrations. **Mycorrhiza**, v. 16, p. 99-109, 2006.
- BROWN, T. L. et al. **Chemistry: the central science**. 14. ed. [s.l.] Pearson Education, 2017.

- CAPUANO, E.; OLIVIERO, T.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. **Modeling food matrix effects on chemical reactivity: Challenges and perspectives. Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2018.
- CAVA, R.; HIGUERO, N.; LADERO, L. High-pressure processing and storage temperature on *Listeria monocytogenes*, microbial counts and oxidative changes of two traditional dry-cured meat products. **Meat Science**, v. 171, 2021.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. [s.l: s.n.].
- DELIGNETTE-MULLER, M. L.; ROSSO, L.; FLANDROIS, J. P. Accuracy of microbial growth predictions with square root and polynomial models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, n. 2–3, 1995.
- EGOROV, A. V.; LYUBARTSEV, A. P.; LAAKSONEN, A. Molecular dynamics simulation study of glycerol-water liquid mixtures. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 49, 2011.
- FREITAS, J. F. DE et al. SOCOL: A INDICAÇÃO GEOGRÁFICA COMO PROMOTORA DE AVANÇOS NA LEGISLAÇÃO SANITÁRIA. **Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural**, v. 11, n. 12, p. 38–48, 2021.
- GERLAI, R. **Zebra fish: An uncharted behavior genetic model**. Behavior Genetics. **Anais...2003**.
- GRANATO, D.; DE ARAÚJO CALADO, V. Ô. M.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, 2014.
- HAN, J. W. et al. A comprehensive review of cold chain logistics for fresh agricultural products: Current status, challenges, and future trends. **Trends in Food Science and Technology**, 2021.
- HARPER, W. J.; HEWITT, S. A.; HUFFMAN, L. M. Model food systems and protein functionality. Em: **Milk Proteins: From Expression to Food**. [s.l: s.n.].
- HILL, W. J.; HUNTER, W. G. A Review of Response Surface Methodology: A Literature Survey. **Technometrics**, v. 8, n. 4, 1966.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. [s.l: s.n.].
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Tabela de dados das estações**. Disponível em: <<https://tempo.inmet.gov.br/TabelaEstacoes/A001>>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- KOGO, B. K.; KUMAR, L.; KOECH, R. Climate change and variability in Kenya: a review of impacts on agriculture and food security. **Environment, Development and Sustainability**, 2021.
- MATHEW, D. G. et al. A Review on Zebra Fish as an Experimental Model for Studying Craniofacial Development Disorders. **Oral & Maxillofacial Pathology Journal**, v. 11, n. 2, p. 57, 2020.

- MATTICK, K. L.; JORGENSEN, F.; LEGAN, J. D.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; HUMPHREY, T. J. Habituation of *Salmonella* spp. at reduced water activity and its effect on heat tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4921-4925, 2000.
- MILEA, Ş. A. et al. Combination of freeze drying and molecular inclusion techniques improves the bioaccessibility of microencapsulated anthocyanins from black rice (*Oryza sativa* L.) and lavender (*Lavandula angustifolia* L.) essential oils in a model food system. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 12, 2020.
- MUTZ, Y. DA S. et al. *Salmonella enterica*: A hidden risk for dry-cured meat consumption?. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2020.
- OSCAR, T. P. Validation of lag time and growth rate models for *Salmonella* Typhimurium: Acceptable prediction zone method. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 2, 2005.
- RODRÍGUEZ, A. et al. The influence of salt (NaCl) on ochratoxin A biosynthetic genes, growth and ochratoxin A production by three strains of *Penicillium nordicum* on a dry-cured ham-based medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 178, 2014.
- ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 5, 1996.
- ROSS, T.; DALGAARD, P.; TIENUNGOON, S. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 3, 2000.
- SCOTT, W. J. Water relations of food spoilage microorganisms. In: **Advances in food research**. Academic Press, 1957. p. 83-127.
- SMET, C. et al. Influence of food intrinsic factors on the inactivation efficacy of cold atmospheric plasma: Impact of osmotic stress, suboptimal pH and food structure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, 2016.
- TOLDRÁ, F. **Dry-Cured Meat Products**. [s.l: s.n.].
- TORNBERG, E. Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products. **Meat Science**. 2005.
- VAN LONG, N. N.; RIGALMA, K.; COROLLER, L.; DADURE, R.; DEBAETS, S.; MOUNIER, J.; VASSEUR, V. Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods. **Food microbiology**, v. 68, p. 7-15, 2017.
- WAKAMATSU, J. et al. Establishment of a model experiment system to elucidate the mechanism by which Zn-protoporphyrin IX is formed in nitrite-free dry-cured ham. **Meat Science**, v. 68, n. 2, 2004.

YOLMEH, M.; JAFARI, S. M. **Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. Food and Bioprocess Technology**, 2017.

YU, J. et al. Characterization and determination of nanoparticles in commercial processed foods. **Foods**, v. 10, n. 9, 2021.

ZAREEF, M. et al. An Overview on the Applications of Typical Non-linear Algorithms Coupled With NIR Spectroscopy in Food Analysis. **Food Engineering Reviews**, 2020.

#### 4. ARTIGO ORIGINAL 2

### MODELAGEM DO EFEITO COMBINADO DE ATIVIDADE DE ÁGUA, CLORETO DE SÓDIO E TEMPERATURA EM SISTEMA MODELO DE SOCOL: COMPORTAMENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* E INATIVAÇÃO EM FLUIDO GÁSTRICO SIMULADO

Eniale de Melo Oliveira<sup>1</sup>, Maria Eduarda Nascimento de Jesus<sup>2</sup>, Pedro Henrique Alves Martins<sup>1</sup>, Sérgio Henriques Saraiva<sup>1</sup>, Consuelo Domenici Roberto<sup>1</sup>, Denes Kaic Alves do Rosário<sup>1</sup>, Patrícia Campos Bernardes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre - ES, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre - ES, Brasil

\*autor correspondente: patricia.bernardes@ufes.br

**RESUMO:** Produtos cárneos curados a seco e maturados, embora apresentem baixa atividade de água, podem apresentar riscos de patógenos, principalmente psicrotróficos caso a refrigeração faça parte da cadeia produtiva. Entretanto, pouco é conhecido sobre o comportamento de *Listeria monocytogenes* em condições de processamento de produtos cárneos curados a seco tradicionais. Portanto, este estudo investigou a influência da atividade de água ( $A_w$ ) (0,806 e 0,974), concentração de cloreto de sódio (NaCl) (1,97 e 9,53 % (p/p)) e da temperatura ( $T$ ) (0,9 e 31,1 °C) no crescimento e/ou sobrevivência de *L. monocytogenes* em sistema modelo de Socol (SMS), nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas de incubação. Avaliou-se também a sobrevivência de *L. monocytogenes* em fluido gástrico simulado (FGS) após 72h de incubação do SMS. O DCCR foi utilizado em um arranjo  $2^3$  em ordem aleatória. A qualidade do ajuste dos modelos foi determinada. A normalidade dos dados residuais foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk. A falta de ajuste, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) ( $\geq 0,96$ ), o fator de precisão ( $A_f$ ) ( $\geq 1,14$ ) do modelo e o fator de viés ( $B_f$ ) ( $\geq 1,14$ ) do modelo foram medidos. Além disso, foi avaliada a zona de predição aceitável do modelo. Os modelos descreveram completamente como os parâmetros  $A_w$ , NaCl e  $T$  afetaram o comportamento de *L. monocytogenes* em SMS, com ótimos resultados na validação. O fator de maior influência foi a  $A_w$ , ditando proporcionalmente o comportamento do patógeno estudado, com maior multiplicação em níveis mais altos de  $A_w$  ( $>0,92$ ). Concentrações menores de NaCl, mas ainda consideradas altas ( $<6\%$ ) levaram a sua maior multiplicação. A temperatura não exerceu influência significativa no crescimento e/ou sobrevivência de *L. monocytogenes* no SMS indicando que a bactéria é capaz de sobreviver mesmo em temperaturas de refrigeração. A bactéria foi inativada no FGS em todas as condições testadas. Considerando que *L. monocytogenes* é um agente patogênico de alto risco, com uma taxa de mortalidade significativa e, que a inativação completa em SMS não foi alcançada, os resultados deste estudo reforçam a necessidade do controle da  $A_w$  do produto. Dessa forma, além do controle das variáveis testadas, o uso de matéria-prima de boa qualidade e cuidados higiênicos durante a produção precisam ser rigorosamente respeitados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Carne curada a seco e maturada. Inativação microbiológica. Metodologia superfície resposta. Produto cárneo pronto para consumo. Segurança do alimento.

## 1. INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, onipresente e psicrotrófica (Edgcomb et al., 2000; Schoder, 2015; Swaminathan; Gerner-Smidt, 2007). Possui capacidade de sobreviver em ampla faixa de temperaturas (-1,5 até 45 °C) com temperatura ideal de multiplicação entre 30 e 37°C, amplas condições de pH (4,4 – 9,4) e em altas concentrações de sal (até 14%). É um microrganismo patogênico, capaz de atravessar as barreiras intestinais humanas, hematoencefálica e feto-placentária, responsável por causar a listeriose (Schoder, 2015; Swaminathan; Gerner-Smidt, 2007). *L. monocytogenes* já foi encontrada em solos (CLAXTON et al., 2023) e água (Kayode et al., 2021). Além disso, várias investigações demonstram que *L. monocytogenes* está amplamente distribuída em ambientes de processamento de alimentos e utensílios (D'Arrigo et al., 2020; Schäfer et al., 2017), sendo responsável pela doença denominada Listeriose.

A listeriose é uma das mais graves doenças de origem alimentar sob vigilância da União Europeia (UE) (European Food Safety Authority, 2023). Entre suas manifestações clínicas estão a gastroenterite, bacteremia, meningite, aborto espontâneo e morte (Schoder, 2015; Swaminathan; Gerner-Smidt, 2007). Em 2022, foi a quinta zoonose mais comumente relatada em humanos na UE. Apesar de ser a quinta mais relatada, estava entre as duas doenças mais graves e com maiores taxas de letalidade (18,1%). No mesmo ano, entre os veículos alimentares mais comuns para os surtos de origem alimentar de listeriose estavam os produtos cárneos (European Food Safety Authority, 2023). Nos Estados Unidos, um levantamento realizado na literatura científica entre 1990 e 2020, demonstrou que mais de 90% dos surtos dessa doença foram relacionados a produtos cárneos fatiados prontos para o consumo (Sampedro et al., 2022).

Na região Serrana do estado do Espírito Santo, Brasil, é produzido o Socol, um produto cárneo obtido do lombo de suínos, salgado, adicionado de condimentos, envolto por peritônio de suínos, maturado e dessecado, podendo ou não ser adicionado de nitrito e nitrato (Espírito Santo, 2019). É originário da região de Veneto, na Itália. Sua produção foi introduzida no estado do Espírito Santo no início do século XX pelos imigrantes italianos, especificamente para o município de Venda Nova do Imigrante (Freitas et al., 2021).

Apesar dos produtos curados a seco e maturados serem amplamente reconhecidos como produtos seguros, devido ao baixo pH e atividade de água ( $A_w$ ), além da concentração de sal e a presença de ingredientes em sua formulação que podem atuar como antimicrobianos, em várias etapas de produção pode ocorrer a multiplicação/sobrevivência de microrganismos, sejam eles benéficos, deterioradores e/ou patogênicos. Um desses microrganismos é *L. monocytogenes*, que pode se desenvolver em várias etapas de fabricação do Socol (Cava et al., 2021; Freitas et al., 2021).

Em um produto como o Socol, os microrganismos presentes estão expostos a vários estresses subletais devido às próprias características do produto. A combinação desses estresses subletais, como o teor de sal, diferentes temperaturas e a baixa atividade de água, causam perturbação da homeostase dos microrganismos. Essa é a chave para a conservação desses alimentos (Leistner, 2000; Mutz et al., 2019). Porém, os microrganismos podem desenvolver mecanismos de resposta a esses estresses, levando à sua multiplicação e/ou sobrevivência, aumentando assim as preocupações com a segurança dos alimentos em relação à contaminação por *L. monocytogenes*. Além disso, microrganismos resistentes podem persistir mesmo após o final do período de armazenamento (Mutz et al., 2019).

Para superar o estresse das condições de baixa temperatura, *L. monocytogenes* é capaz de ativar estratégias adaptativas, como o controle da fluidez da membrana aumentando suas insaturações, a síntese de proteínas de choque frio (Csp) e de proteínas de aclimação ao frio (Cap). Já para superar o estresse osmótico, a célula pode aumentar seus níveis de solutos internos (solutos compatíveis), resultando em aumento da pressão osmótica no interior da célula, consequentemente, na recuperação do turgor celular (Beales, 2004).

A adaptação do microrganismo a esses diferentes estresses pode aumentar sua sobrevivência através da passagem gastrointestinal humana durante o processo digestivo do hospedeiro (Alves et al., 2020; Chihib et al., 2003; Mutz et al., 2019). A superação de múltiplas barreiras gastrointestinais é o primeiro passo no processo de infecção por *L. monocytogenes* (Gahan; Hill, 2005). Ainda, a possibilidade de sobrevivência de patógenos no ambiente ácido do fluido gástrico humano é fundamental para a saúde pública (Alves et al., 2020; Mutz et al., 2019). Essa sobrevivência gastrointestinal pode ser medida usando ensaios de modelo *in vitro*

(Alves et al., 2020; Barbosa et al., 2012). Já foi demonstrado que a exposição ao estresse frio e osmótico aumenta a sobrevivência de *L. monocytogenes* durante a passagem pelo trato gastrointestinal simulado (Alves et al., 2020). Este fato aumenta a preocupação com a segurança dos alimentos.

Tendo em vista a escassez de estudos relacionados ao Socol e, sabendo que a veiculação de *L. monocytogenes* entre os alimentos se dá principalmente através de produtos cárneos e alimentos prontos para consumo (Cava; Higuero; Ladero, 2021; Cavalcanti et al., 2022), se faz necessário o estudo das condições de processamento, em termos microbiológicos, para que possa ser avaliado o risco de contaminação ou multiplicação/sobrevivência desse patógeno. Nesse contexto, o presente estudo visou avaliar se nas condições de temperatura, atividade de água e concentrações de cloreto de sódio, que são utilizadas durante o processo de produção do Socol, *L. monocytogenes* é capaz de se multiplicar/sobreviver. E, se a exposição à essas condições favorecem a sua sobrevivência em fluido gástrico simulado, para que se obtenha dados científicos que possam ser utilizados na estimativa do risco microbiológico de sobrevivência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos como o Socol.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Desenho experimental**

O estudo avaliou o efeito da atividade de água ( $A_w$ ), cloreto de sódio (NaCl) e temperatura (T) na contagem de *L. monocytogenes* em sistema modelo a base de Socol (SMS). Os experimentos foram realizados utilizando o Delineamento composto central Rotacional (DCCR), composto por três fatores (Tabela 1). Foram conduzidos 17 ensaios (Tabela 4), com três repetições no ponto central, para avaliar o erro experimental e, portanto, a falta de ajuste do modelo. Os ensaios foram realizados em ordem aleatória para reduzir possível viés experimental. Foi utilizado o software Statistica 12<sup>®</sup> para análise dos dados. As análises do experimento foram realizadas em duplicatas.

A faixa de temperatura foi escolhida considerando a temperatura de refrigeração usual de produtos cárneos e as médias das temperaturas do verão e inverno (0,9 – 31,1 °C) na cidade de Venda Nova do Imigrante/ES, local de produção do Socol (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, 2023). Para  $A_w$ , foi

escolhida uma faixa que correspondesse às  $A_w$  encontradas desde o início da produção, com o lombo suíno cru, até o Socol pronto (0,806 – 0,974). Para isso, foram medidas  $A_w$  de doze peças de Socol, de quatro diferentes produtores, utilizando o LabMaster-aw (Novasina, Suíça). Para definir a faixa utilizada de NaCl (1,97 – 9,53 %) foi feita análise do teor de cloretos destas mesmas peças, conforme descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), em que se obteve entre 4-8% de cloretos. Também foi considerado o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Socol, que estabelece que o Socol deve apresentar como ingrediente obrigatório no mínimo de 2,5% de sal (ESPÍRITO SANTO, 2019).

Tabela 1: Variáveis independentes codificadas e não codificadas de acordo com o delineamento composto central rotacional.

Fatores	Níveis				
	-1,6818	-1	0	+1	+1,6818
$A_w$	0,806	0,840	0,890	0,940	0,974
T	0,9	7	16	25	31,1
NaCl	1,97	3,5	5,75	8	9,53

$A_w$ : atividade de água; T: temperatura (°C); NaCl: cloreto de sódio (%).

O sistema modelo a base de Socol foi preparado de acordo como descrito no Artigo 1 dessa dissertação.

## 2.2. Modelagem matemática e validação do modelo

Para obter o modelo polinomial (Equação 1) que descreve o efeito das variáveis independentes ( $A_w$ , T e NaCl) na sobrevivência e/ou multiplicação de *L. monocytogenes* no SMS foi realizada a análise de regressão múltipla utilizando o Software Estatística 12<sup>®</sup>. O nível de significância adotado para fatores significativos compõem o modelo foi de 0,05. A normalidade dos dados do resíduo foi feita utilizando o teste de Shapiro-Wilk. A representação gráfica do modelo foi feita utilizando a metodologia de superfície de resposta. A medida de ajuste utilizada para avaliar a proporção da variação explicada pelo nível da variável independente do modelo nos dados foi o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

$$(\text{Log } N/N_0) = B_0 + \sum_{i=1}^3 B_i X_i + \sum_{i=1}^3 B_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j>i}^3 B_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

Em que, X é a variável independente (Aw, T ou NaCl), B é o coeficiente de regressão e  $\varepsilon$  é o erro experimental.

A validação do modelo foi feita com condições experimentais aleatórias adicionais (Tabela 2 – seção 3.1) que não foram utilizadas para a construção do modelo. Os experimentos foram feitos de acordo com o item 2.1. Os valores de atividade de água utilizados para validação foram: 0,820, 0,840, 0,950, 0,910, 0,860 e 0,930. Para temperatura foram utilizados os valores: 2, 30, 11, 22, 20, 27 °C e para Cloreto de sódio: 2,5, 8,5, 4,5, 4,0, 5,0, 7,0 % (p/p), combinados respectivamente.

O fator de precisão ( $A_f$ ) e o fator de viés ( $B_f$ ) foram calculados segundo (BARANYI; PIN; ROSS, 1999) (Equações (2) e (3)), respectivamente, utilizando o conjunto de dados das condições experimentais adicionais, citadas acima.

$$A_f = \exp \left( \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m (\ln f(x^{(k)}) - \ln \mu^{(k)})^2}{m}} \right) \quad (2)$$

$$B_f = \exp \left( \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m (\ln f(x^{(k)}) - \ln \mu^{(k)})}{m}} \right) \quad (3)$$

Em que  $\ln f(x)$  é o valor predito pelo modelo,  $\ln \mu$  o valor observado e m o número de experimentos.

Para avaliar a zona de predição aceitável da equação, o erro relativo (ER) foi calculado conforme a Equação (4) (DELIGNETTE-MULLER; ROSSO; FLANDROIS, 1995), utilizando o conjunto de dados usados na modelagem.

$$ER = \frac{\text{Log } (N/N_0)_{\text{observada}} - \text{Log } (N/N_0)_{\text{predita}}}{\text{Log } (N/N_0)_{\text{predita}}} \quad (4)$$

### 2.3. Preparo do inóculo de *L. monocytogenes*

A cultura estoque de *L. monocytogenes* (ATCC 7644) foi mantida armazenada em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (ACUMEDIA, Michigan, USA) contendo 20% (v/v) de glicerol à  $-80 \pm 1^\circ\text{C}$ , enquanto as culturas de trabalho foram mantidas a  $-20 \pm 1^\circ\text{C}$  e renovadas quinzenalmente usando ágar Oxford (ACUMEDIA, Michigan, USA). Para a ativação do microrganismo e preparo do inóculo, uma alíquota do criotubo foi retirada com alça de platina e transferida para o caldo BHI, mantida a

37°C/24 horas. Esse processo foi repetido mais uma vez, ocorrendo assim duas ativações consecutivas para posteriormente serem estriadas em ágar Oxford e incubadas a 37°C/48h.

As culturas de trabalho foram obtidas transferindo uma única colônia exibindo morfologia característica e pureza, confirmadas por coloração de Gram, do ágar Oxford para 10 mL de caldo BHI e incubada a 37°C/24 horas. A densidade celular do inóculo foi de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL, confirmado por contagens em ágar Oxford (ACUMEDIA, Michigan, USA).

#### **2.4. Contaminação artificial do SMS com *L. monocytogenes***

A cultura bacteriana foi centrifugada (Excelsa II, FANEM, Brasil) a 5.580g durante 10 min a 4°C. Os *pellets* celulares foram concentrados em 1 mL de solução salina 0,85%, para ajuste do inóculo inicial de  $10^9$  UFC/mL, confirmado por contagens em ágar Oxford (ACUMEDIA, Michigan, USA). O inóculo inicial com alta contagem de *L. monocytogenes* foi utilizado para visualizar melhor uma possível redução durante o processo. Cem microlitros do inóculo foram transferidos para a superfície do SMS em placa de Petri, espalhado com alça de Drigalski e incubados nas temperaturas estabelecidas pelo DCCR (Tabela 1). A população inicial de *L. monocytogenes* no SMS contaminado artificialmente foi avaliada conforme descrito no item 2.4. e revelou ser, em média  $5,0 \pm 0,5 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>.

#### **2.5. Quantificação de *L. monocytogenes* no SMS**

A quantificação de *L. monocytogenes* no SMS foi feita logo após a inoculação e nos tempos 12, 24, 48 e 72 horas, em duplicata. Para isso, o SMS foi retirado por completo da Placa de Petri (15 g) e homogeneizado com 135 mL de solução salina 0,85 % em Stomacher (Didática SP, São Paulo, Brasil) por 2 minutos, seguido de diluição decimal seriada e plaqueamento em ágar Oxford (ACUMEDIA, Michigan, USA) pelo método *Spread Plate*. A variação decimal (VD), seja a redução ou o aumento da contagem, foi calculada como variação logarítmica entre a contagem final e inicial ( $\log N/N_0$ ). Os resultados foram expressos em  $\log$  UFC/cm<sup>2</sup> considerando-se a área da superfície da placa de Petri (53 cm<sup>2</sup>). O limite de detecção foi de 2  $\log$  UFC/cm<sup>2</sup>.

## **2.6. Sobrevivência de *L. monocytogenes* em fluido gástrico simulado (FGS)**

A sobrevivência de *L. monocytogenes* em FGS foi avaliada após exposição prévia ao SMS nas mesmas condições experimentais estabelecidas pelo DCCR. O tempo de incubação selecionado para essa etapa foi o de 72h, pois, este foi o maior tempo estudado. Após cada ensaio, 15 g das amostras de SMS foram homogeneizadas usando o Stomacher (Didática SP, São Paulo, Brasil) com 135 mL de FGS e incubadas a  $37 \pm 1$  °C por 1h. O FGS foi preparado com 8,3 g de proteose peptona (Kasvi, Paraná, Brasil); 2,05 g de cloreto de sódio (Sciavicco, Brasil); 0,6 g de fosfato de potássio (Dinâmica, São Paulo, Brasil); 3,5 g de D-glicose (Proquímios, Rio de Janeiro, Brasil); 0,11 g de cloreto de cálcio (Dinâmica, São Paulo, Brasil); 0,37 g de cloreto de potássio (Dinâmica, São Paulo, Brasil); 50 mg de extrato de bile de suíno (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); 0,1 g de lisozima de clara de ovo (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 13,3 mg de pepsina da mucosa gástrica de suíno (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por litro de água destilada (Mutz et al., 2021; Samara e Koutsoumanis, 2009). O FGS foi ajustado para pH 2 utilizando ácido clorídrico (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

O FGS adicionado do SMS contendo células de *L. monocytogenes* foi incubado a 37°C por 1h para simular as condições de passagem estomacal. As contagens de *L. monocytogenes* foram realizadas plaqueando-se uma alíquota da suspensão de FGS em ágar Oxford (ACUMEDIA, Michigan, USA), antes e após 1 h de incubação a 37°C. A inativação foi calculada pela diferença logarítmica das contagens final e inicial ( $\log N/N_0$ ). Os resultados foram expressos em  $\log$  UFC/cm<sup>2</sup> considerando-se a área da superfície da placa de Petri (53 cm<sup>2</sup>). O limite de detecção foi de 1  $\log$  UFC/cm<sup>2</sup>.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Modelagem matemática**

O efeito da  $A_w$ , T e NaCl na multiplicação ou sobrevivência de *L. monocytogenes* em SMS incubados à 24, 48 e 72 horas são descritos pelas Equações (5), (6) e (7) respectivamente. As equações demonstram somente os termos significativos individuais e de interação ( $p < 0,05$ ). Em 12 horas de incubação do patógeno em SMS os efeitos não foram significativos, portanto, os resultados não

foram demonstrados e discutidos. A redução média em 12h foi de  $\pm 0,5$  (Log UFC/cm<sup>2</sup>).

Os índices de desempenho calculados para avaliar a adequação dos modelos obtidos e a normalidade dos resíduos do modelo são apresentados na Tabela 3.

$$\text{Log}(N/N_0) = -1,3936 + 6,8193 \cdot A_w + 0,2183 \cdot \text{NaCl} - 0,0266 \cdot \text{NaCl}^2 - 0,7691 \cdot T + 0,8818 \cdot A_w \cdot T \quad (5)$$

$$\text{Log}(N/N_0) = 43,9483 - 75,5163 \cdot A_w - 1,7893 \cdot \text{NaCl} - 0,0516 \cdot \text{NaCl}^2 + 2,6600 \cdot A_w \cdot \text{NaCl} + 2,0247 \cdot A_w \cdot T \quad (6)$$

$$\text{Log}(N/N_0) = 74,2960 - 137,9050 \cdot A_w - 2,3210 \cdot \text{NaCl} - 0,0540 \cdot \text{NaCl}^2 + 3,3770 \cdot A_w \cdot \text{NaCl} + 2,3920 \cdot A_w \cdot T - 0,0160 \cdot \text{NaCl} \cdot T \quad (7)$$

Em que: N é a contagem final (UFC/cm<sup>2</sup>), N<sub>0</sub> é a contagem inicial (UFC/cm<sup>2</sup>), A<sub>w</sub> é a atividade de água, T é a temperatura (°C) e NaCl é a concentração de cloreto de sódio (%).

Os valores residuais das variáveis dependentes possuem distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk ( $P > 0,05$ ) (Granato et al., 2014). A falta de ajuste para as três variáveis não foram significativas (Tabela 3). Esta conclui sobre a variação que o modelo não consegue explicar ser igual ao erro puro, os desvios em relação ao modelo são considerados aleatórios (Smith; Rose, 1995). Os valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), igual a um, indicam ajuste perfeito do modelo aos dados. Este estudo apresentou valores satisfatórios ( $\geq 0,96$ ) (Tabela 3), bem próximos a 1, o que demonstra bom ajuste. Além disso, os modelos apresentaram valores baixos de MSE. O cálculo do MSE considera a variabilidade remanescente do experimento, que pode ser devido aos erros naturais e sistemáticos. Quanto menor seu valor, melhor a adequação do modelo para descrever os dados (Te Giffel; Zwietering, 1999).

Tabela 3. Índices de desempenho do modelo obtido pelo delineamento composto central rotacional para redução e/ou aumento de *Listeria monocytogenes* sob

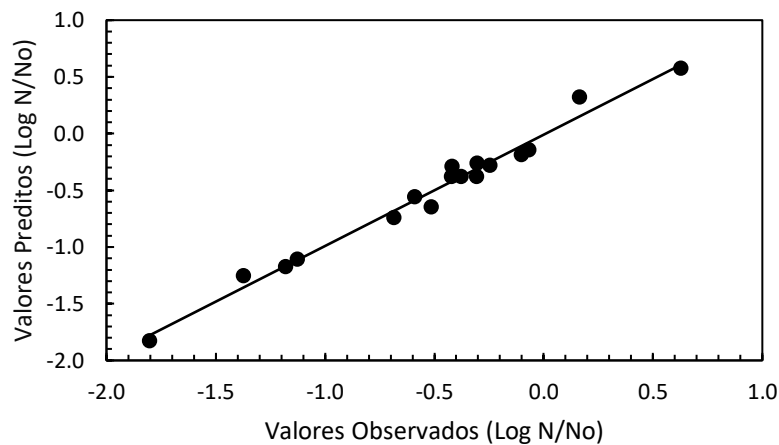
diferentes temperaturas, atividade de água e concentração de cloreto de sódio em sistema modelo de Socol.

Índices	24h	48h	72h
<b>Teste de Shapiro-Wilk (P-valor)</b>	0,60	0,07	0,12
<b>Coefficiente de determinação (R<sup>2</sup>)</b>	0,98	0,96	0,98
<b>Falta de ajuste (P-valor)</b>	0,15	0,16	0,19
<b>MSE</b>	<0,01	0,03	0,02

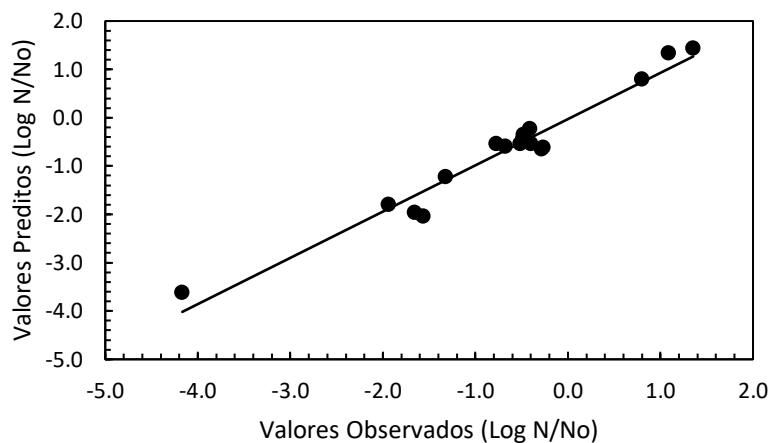
P-valor para teste de normalidade de Shapiro-Wilk; P-valor para a falta de ajuste do modelo pela ANOVA e; (R<sup>2</sup>): coeficiente de determinação do modelo; MSE: Erro Quadrático Médio.

Nas Figuras 1A, 1B e 1C, para 24, 48 e 72 horas, respectivamente, também pode ser observado o o bom ajuste do modelo matemático.

**A**



**B**



C

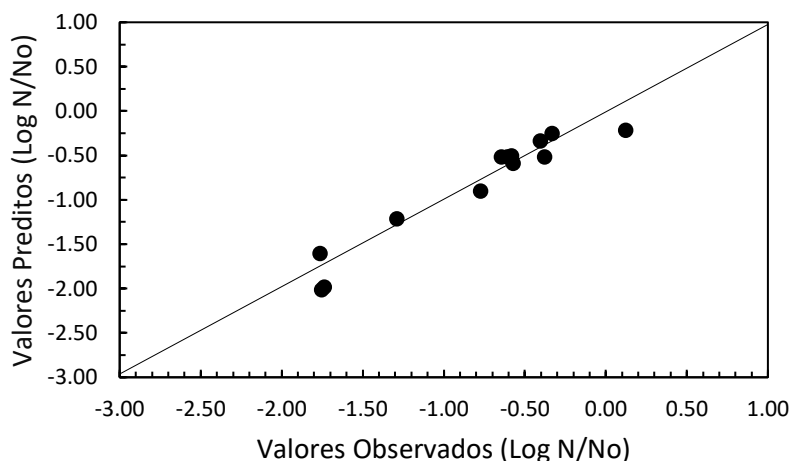


Figura 1: Valores ajustados *versus* valores observados. A: 24h de incubação; B: 48h de incubação e; C: 72h de incubação.

### 3.2 Validação do modelo matemático

Para a validação experimental dos modelos, foram utilizadas condições experimentais aleatórias no cálculo de  $A_f$  e  $B_f$ , que estão dispostas na Tabela 2, bem como os valores observados em cada ensaio e os preditos pelo modelo. Os valores encontrados para  $A_f$  foram de 1,14, 1,27 e 1,31 e, para  $B_f$  foram de 1,14, 1,36 e 1,38 para 24, 48 e 72 horas, respectivamente.

Tabela 2. Condições experimentais adicionais para validação do modelo preditivo para variação decimal de *Listeria monocytogenes* em sistema modelo de Socol variando a atividade de água, cloreto de sódio e temperatura.

Variáveis independentes				Variação decimal (Log UFC/cm <sup>2</sup> )					
Ensaio				24h		48h		72h	
	Aw	T (°C)	NaCl (%)	Obs.	Pred.	Obs.	Pred.	Obs.	Pred.
1	0,82	2	2,5	-0,35	0,04	-0,32	0,42	-0,85	0,47
2	0,84	30	8,5	-2,22	-2,20	-3,14	-3,34	-4,20	-4,25
3	0,95	11	4,5	0,05	0,03	0,17	0,71	0,26	0,68
4	0,91	22	4,0	-0,27	-0,55	-0,07	-0,33	0,56	-0,07

<b>5</b>	0,86	20	5,0	-0,23	-0,73	-0,33	-1,18	-0,65	-1,34
<b>6</b>	0,93	27	7,0	-0,10	-0,47	-0,17	-0,08	-0,30	-0,23

Aw: atividade de água, T: temperatura (°C), NaCl: cloreto de sódio (%). 24, 48 e 72 horas de incubação do SMS.

A multiplicação/sobrevivência de *L. monocytogenes* nos tempos estudados apresentaram valores do fator de viés acima de 1.  $B_f$  indica o nível de concordância entre os valores previstos e observados. Idealmente, este índice deve ter valores iguais a 1. Acima de 1, o fator indica que o modelo superestima as observações em relação as previsões. De acordo com Mejlholm et al., (2010) são aceitáveis valores de  $B_f$  até 1,43. Já  $A_f$  indica a dispersão dos dados em torno da previsão, também devendo estar, idealmente, igual a 1. Porém, existe o limite aceitável, que pode aumentar 0,10–0,15 para cada variável apresentada no modelo preditivo (Ross, 1996; Ross; Dalgaard; Tienungoon, 2000). Neste estudo, como o modelo matemático é composto por três variáveis independentes foram aceitos valores de  $A_f$  inferiores a 1,45. Os valores encontrados de  $A_f$  e  $B_f$  estão dentro do intervalo aceito (Tabela 3). Desta forma, o modelo apresentou desempenho satisfatório na validação experimental.

Modelos que apresentam pelo menos 70% das respostas corretas dentro do intervalo da zona de predição aceitável, tendem a ter bons valores dos fatores de viés e de precisão. Como visto acima,  $A_f$  e  $B_f$ , tiveram bons valores. A zona de previsão aceitável compreende o erro relativo entre -0,3 (considerado seguro) e 0,15 (considerado arriscado). Nesse contexto, a proporção de ER (PER) igual ou maior que 0,7 é considerada ideal. PER é calculado como o número de execuções com erro relativo dentro da zona de previsão aceitável dividido pelo número total de execuções (Oscar, 2005). Neste estudo, foi encontrado valor de PER de 0,71 para as três variáveis de tempo de incubação, 24, 48 e 72 horas (Figura 2A, 2B e 2C, respectivamente). Diante do exposto, todos os índices de desempenho dos modelos avaliados indicam boa qualidade do ajuste. Os modelos descrevem completamente como os parâmetros Aw, T e NaCl afetam o comportamento de *L. monocytogenes* em SMS.

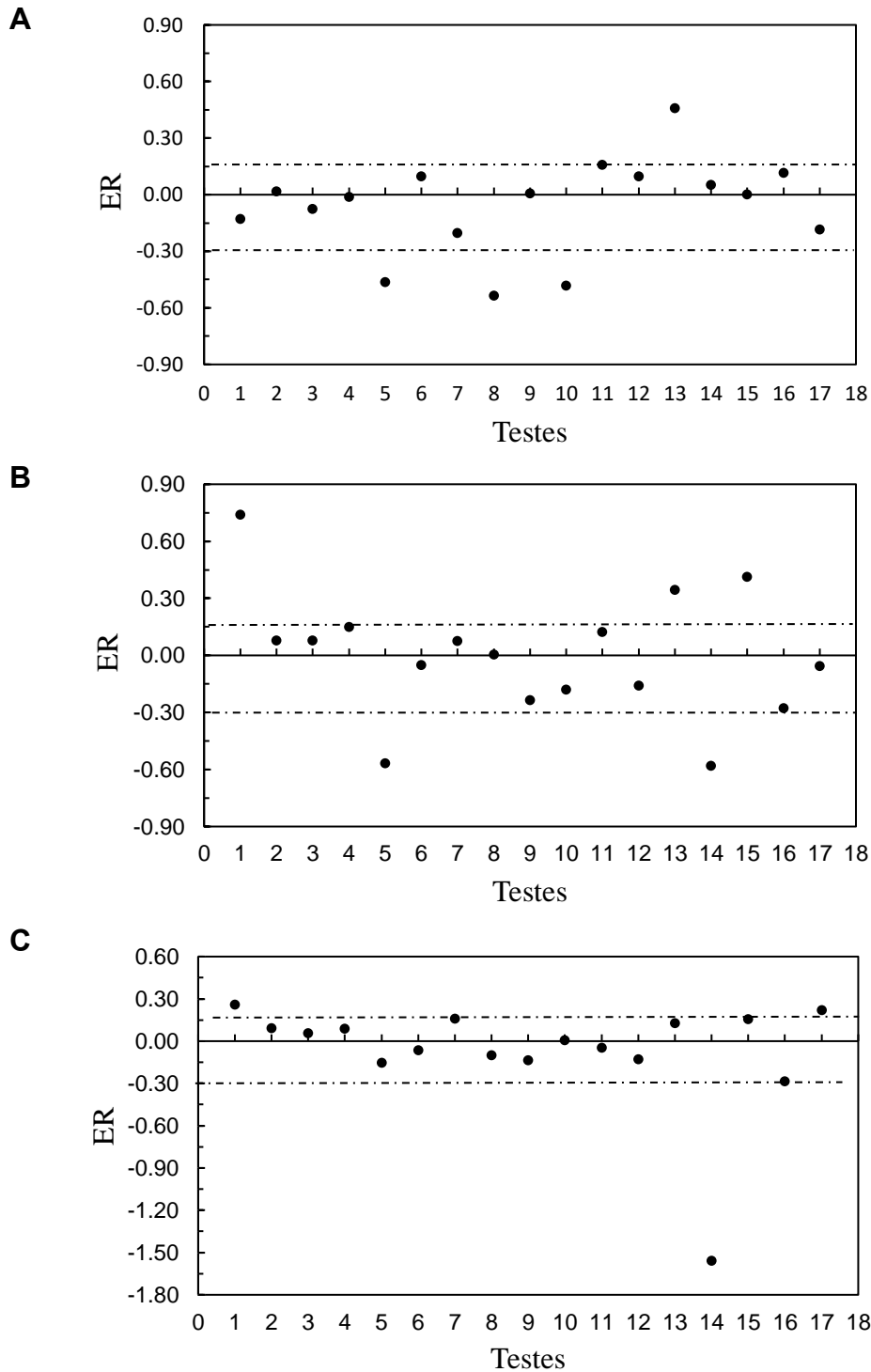


Figura 2: Erro relativo (ER) da variação decimal (VD) de *Listeria monocytogenes* em sistema modelo de Socol variando atividade de água ( $A_w$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e cloreto de sódio (%). Zona de previsão de -0,3 (fail-safe) e 0,15 (fail-dangerous). A: 24h de incubação; B: 48h de incubação e; C: 72h de incubação.

### 3.2. Comportamento de *Listeria monocytogenes* em SMS

Foram estudados os fatores atividade de água, concentração de NaCl e temperatura em diferentes tempos de incubação (12, 24, 48 e 72 horas) do sistema modelo de Socol em relação a redução ou aumento de *Listeria monocytogenes*. Os níveis de cada fator, bem como os resultados da variação decimal em log UFC/cm<sup>2</sup> estão descritos na Tabela 4.

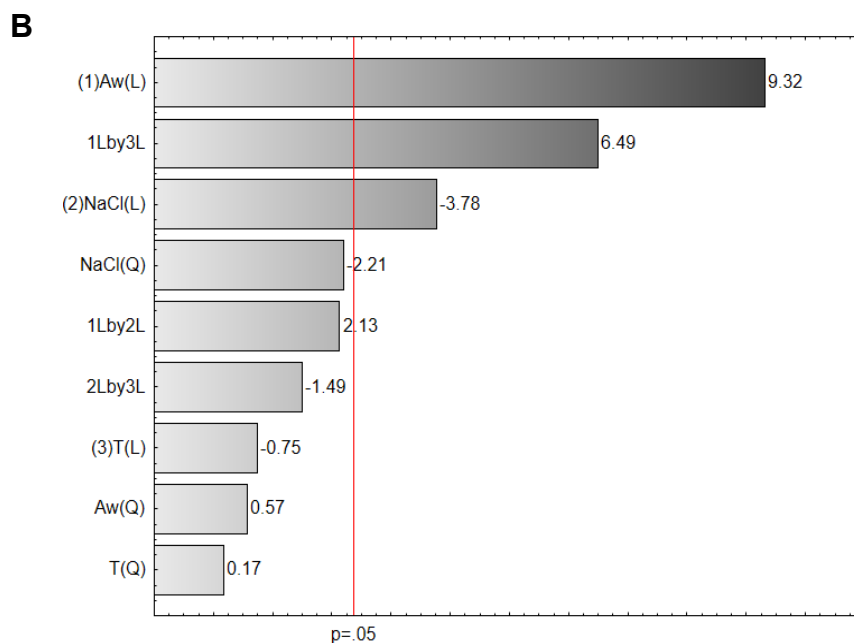
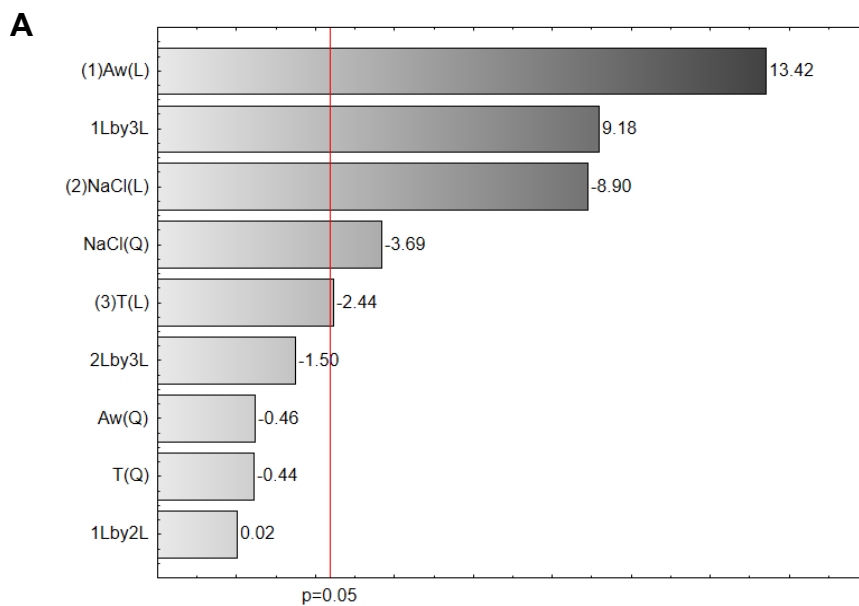
Tabela 4: Variação decimal de *L. monocytogenes* nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas após variação dos fatores atividade de água, temperatura e cloreto de sódio em sistema modelo de Socol, utilizando delineamento composto central rotacional.

Ensaio	Aw	NaCl (%)	T (°C)	VD - 12h (log UFC/cm <sup>2</sup> )	VD - 24h (log UFC/cm <sup>2</sup> )	VD - 48h (log UFC/cm <sup>2</sup> )	VD - 72h (log UFC/cm <sup>2</sup> )
1	0,840	3,50	7,0	-0,20	-0,24	-0,41	-0,33
2	0,840	3,50	25,0	-1,10	-1,13	-1,93	-1,76
3	0,840	8,00	7,0	-0,61	-0,68	-1,32	-1,29
4	0,840	8,00	25,0	-1,09	-1,80	-4,17	-4,17
5	0,940	3,50	7,0	-0,29	-0,10	-0,28	-0,77
6	0,940	3,50	25,0	0,34	0,63	1,35	1,91
7	0,940	8,00	7,0	-0,35	-0,51	-0,48	-0,40
8	0,940	8,00	25,0	-0,46	-0,07	0,80	1,22
9	0,806	5,75	16,0	-0,61	-1,18	-1,56	-1,75
10	0,974	5,75	16,0	-0,03	0,17	1,09	1,80
11	0,890	1,97	16,0	-0,40	-0,30	-0,67	-0,57
12	0,890	9,53	16,0	-0,62	-1,37	-1,65	-1,73
13	0,890	5,75	0,9	-0,39	-0,42	-0,48	-0,58
14	0,890	5,75	31,1	-0,93	-0,59	-0,26	0,13
15	0,890	5,75	16,0	-0,45	-0,38	-0,77	-0,61
16	0,890	5,75	16,0	-0,98	-0,42	-0,39	-0,38
17	0,890	5,75	16,0	-0,48	-0,31	-0,51	-0,64

Aw: atividade de água, T: temperatura (°C), NaCl: cloreto de sódio (%). VD: variação decimal (log UFC/cm<sup>2</sup>).

\*População inicial de *L. monocytogenes* no tempo 0h em média  $5,00 \pm 0,47 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>.

As Figuras 3A, 3B e 3C, para 24, 48 e 72 horas, respectivamente, demonstram o Diagrama de Pareto com os efeitos padronizados, estes permitem identificar quais fatores possuem maior influência na variável resposta, com base na magnitude dos seus efeitos. Durante todo o tempo estudado, o efeito de maior influência no comportamento de *Listeria monocytogenes* foi a atividade de água, esta possui uma relação diretamente proporcional ao comportamento de *Listeria*. Ao aumentar a  $A_w$ , aumenta a multiplicação deste patógeno. Além disso, outro fator importante e significativo ao longo do tempo estudado, foi o NaCl. Este possui uma relação inversamente proporcional à redução de *Listeria*.



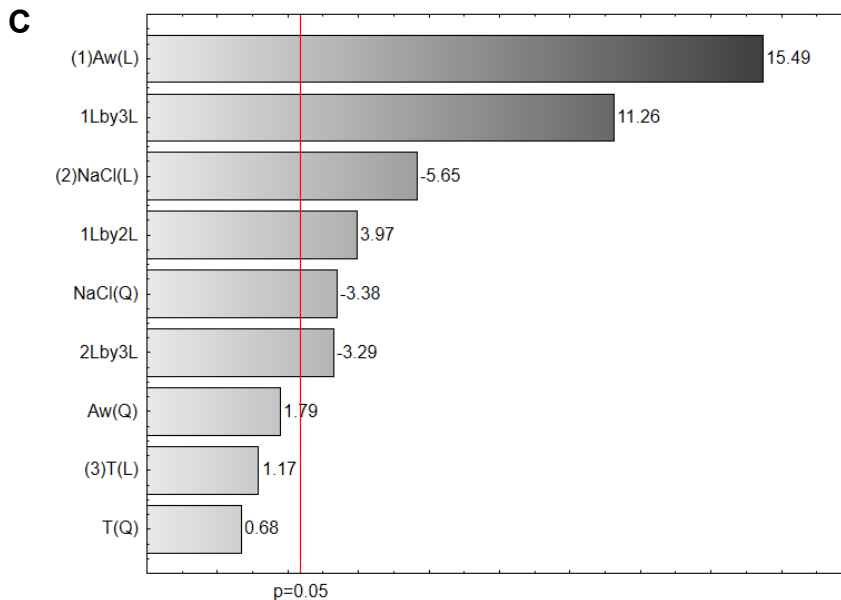


Figura 3: Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para variação decimal de *Listeria monocytogenes* em A: 24h, B: 24h e C: 72h. Aw: Atividade de água, NaCl: cloreto de sódio (%), T: temperatura (°C), L: termo linear, Q: termo quadrático.

Na fase inicial de 24 horas, a análise revelou significância estatística para os parâmetros Aw, T e NaCl, com uma interação significativa entre Aw e T. Assim como na Figura 3, a Figura 4 indica a predominância do efeito da Aw no comportamento de *Listeria monocytogenes*. As linhas cinza na Figuras 4 indicam onde o comportamento de *Listeria* foi nulo, não havendo multiplicação ou redução. À esquerda desta linha cinza ocorre redução, à direita ocorre multiplicação.

Valores abaixo de 0,92 de Aw, foram associados a uma redução de *L. monocytogenes*, enquanto em cerca de 0,96-0,98 de Aw e concentrações de NaCl de até 6% foi possível observar um crescimento (Figura 4A). Em temperaturas > 13°C e em Aw mais altas (>0,92), *Listeria* se multiplicou (Figura 5B e 6B). Pode-se observar a predominância do efeito do NaCl no comportamento de *L. monocytogenes* em relação temperatura. Em contrações de NaCl > 7% ocorreram reduções mais pronunciadas, principalmente em temperaturas > 20°C (Figura 4C).

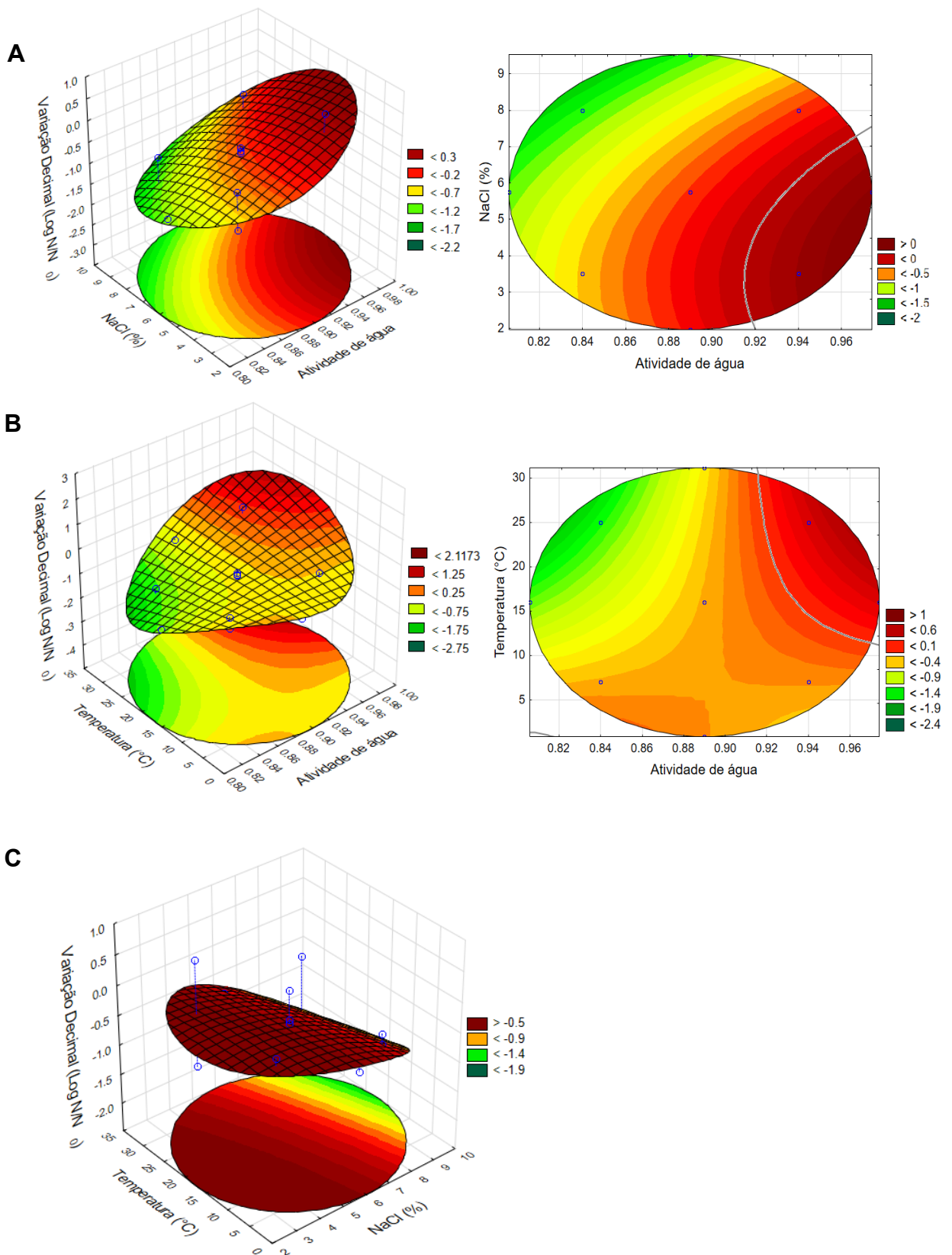


Figura 4: Gráficos de superfície de resposta da variação decimal (Log N/N<sub>0</sub>) de *Listeria monocytogenes* em Sistema modelo de Socol após 24h. A: A: efeito da atividade de água e do NaCl (%). B: efeito da da atividade de água e da temperatura (°C). C: efeito da temperatura (°C) e do NaCl (%).

Em 48 horas, apenas Aw e NaCl mantiveram efeitos significativos, com interação também significativas entre Aw e T (Figura 3B). Esses efeitos significativos foram mantidos na análise estendida para 72 horas, acrescentando a significância do termo NaCl quadrático e as interações entre Aw e NaCl e entre T e NaCl. A influência predominante da Aw na redução e/ou multiplicação de *L. monocytogenes* aumentou em 72 horas (Figura 3C), indicando uma consistência nos mesmos padrões observados em 24 horas.

O aumento gradual da atividade de água na ampla faixa de NaCl estudada resultou em um aumento de *L. monocytogenes*. Acima de 0,92 de Aw passou a ocorrer multiplicação e, acima de 0,94 teve multiplicação em todas as concentrações de NaCl testadas (Figura 5A e 6A). A medida que o tempo de estudo aumenta, é possível observar que a zona de multiplicação aumenta (Figuras 5A e 6A), isso porque ela passa a se multiplicar em Aw menores (0,91, por exemplo), ou seja, a Aw limítrofe para sua redução/multiplicação, reduz, bem como o valor limítrofe de NaCl.

Em temperaturas acima de 10°C, passa a ocorrer multiplicação de *Listeria* associada a Aw >0,94, com multiplicação mais acentuada em T > 20°C. As reduções mais acentuadas são observadas em Aw < 0,86 e em temperaturas mais altas (>20°C). A bactéria consegue tolerar por mais tempo Aw baixas (< 0,87) quando está em temperaturas menores (<15°C), se comparada a temperaturas maiores (Figuras 5B e 6B). Quanto maior a Aw, menor a temperatura necessária para a multiplicação de *Listeria*.

Ao analisar as curvas de níveis temperatura *versus* NaCl (Figuras 5C e 6C), observou-se a predominância do efeito do NaCl na redução ou aumento de *L. monocytogenes*, sendo mais acentuada a redução em concentrações de NaCl maiores. Em 24h e 48h, ao analisar as superfícies da interação de Aw e T, foram notados somente reduções. Em 72h já possível ver a partir da linha cinza representada no gráfico, que passa a ocorrer multiplicação de *Listeria* em concentrações menores de NaCl (< 5%) e T > 25°C.

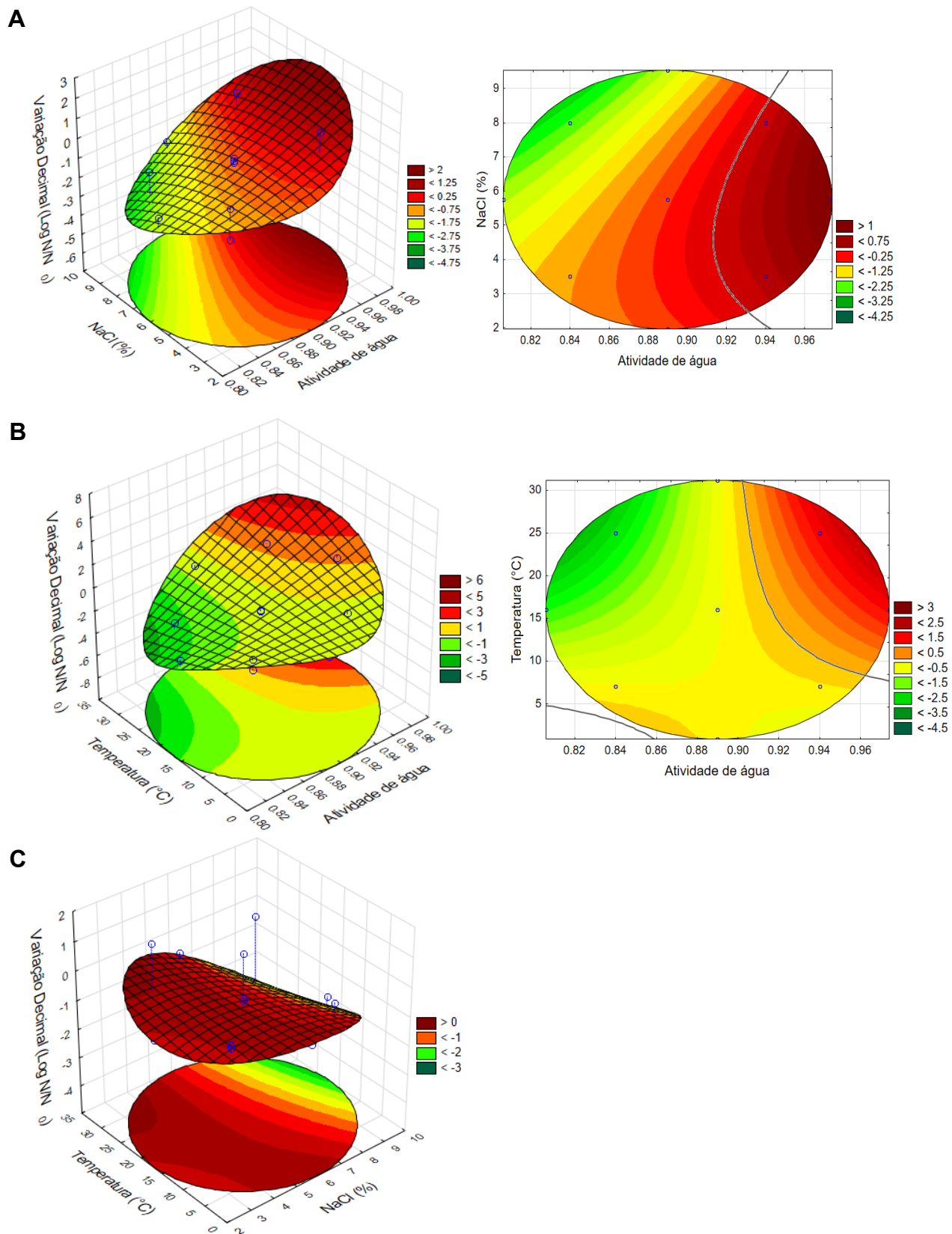


Figura 5: Gráficos de superfície de resposta da variação decimal (Log N/N<sub>0</sub>) de *Liste monocytogenes* em Sistema modelo de Socol após 48h horas. A: efeito da atividade

de água e do NaCl (%). B: efeito da da atividade de água e da temperatura (°C). C: efeito da temperatura (°C) e do NaCl (%).

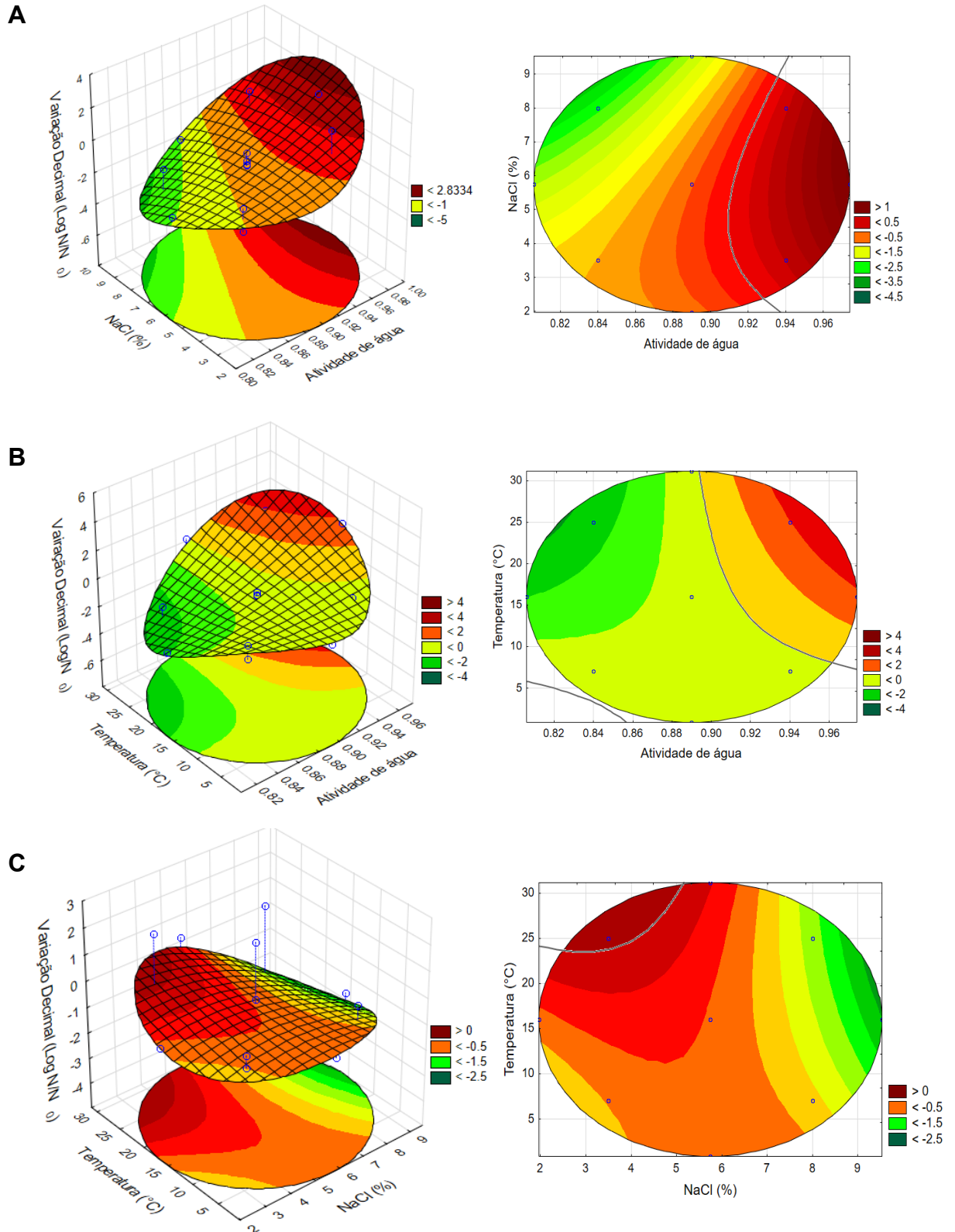


Figura 6: Gráficos de superfície de resposta da variação decimal (Log N/N<sub>0</sub>) de *Listeria monocytogenes* em Sistema modelo de Socol após 72 horas. A: efeito da atividade de

água e do NaCl (%). B: efeito da da atividade de água e da temperatura (°C). C: efeito da temperatura (°C) e do NaCl (%).

Os resultados desta pesquisa destacam a complexa interação entre os fatores críticos de atividade de água ( $A_w$ ), concentração de cloreto de sódio (NaCl) e temperatura (T), na produção de Socol, um produto cárneo curado a seco e maturado, e seu impacto no desenvolvimento de *L. monocytogenes*. Em resumo, as superfícies de resposta e os efeitos padronizados (Figura 3), revelam que, ao longo do tempo de incubação do SMS, a atividade de água emerge como um fator crucial, demonstrando uma relação direta com a multiplicação de *L. monocytogenes*. Alguns estudos corroboram com este resultado e, assim como o presente estudo alcançaram a maior inativação de *L. monocytogenes* em  $A_w$  mais baixas, bem como em altas concentrações de sal (Bover-Cid et al., 2015; Magalhães et al., 2016; Serra-Castelló et al., 2020).

A  $A_w$  reflete as interações que ocorrem entre as moléculas de água e os constituintes dos alimentos e, está relacionada a água livre ou não ligada presente nos alimentos. A água livre participa de processos biológicos e químicos nos alimentos (Damodaran and Parkin, 2019). Quanto maior atividade de água, maior o crescimento microbiano, conforme foi observado neste estudo. *L. monocytogenes*, apesar de requerer um mínimo de 0,90 de  $A_w$  para multiplicação, pode tolerar  $A_w$  menores sem ocorrer sua completa inativação e, sobreviver no Socol conforme observado, o que pode leva-la a ativar mecanismos de resposta ao estresse osmótico (Farber; Coates; Daley, 1992; Koutsoumanis; Kendall; Sofos, 2004; Ly; Parreira; Farber, 2019).

As células bacterianas acumulam solutos no citoplasma em concentrações muito superiores às necessárias para o metabolismo da célula para garantir que a direção do fluxo de água, durante o crescimento, seja para dentro da célula. Conseqüentemente, possuem uma pressão osmótica interna maior que a do meio circundante, resultando na pressão de turgor exercida contra a parede celular que fornece a força necessária para seu crescimento (O'Byrne; Booth, 2002). Normalmente, em meio com  $A_w$  reduzida, a água se difunde do citoplasma da célula para o meio externo e o turgor celular é perdido. Ocorre perturbação da homeostase e o microrganismo não se multiplica, apesar de poder permanecer viável (Barbosa-Cánovas et al., 2020; Gutierrez; Abee; Booth, 1995). Este mecanismo pode explicar a

maior inativação de *L. monocytogenes* ter ocorrido em baixa  $A_w$  e alta concentração de sal, em aproximadamente 0,83 de  $A_w$  nos três tempos de incubação estudados, bem como em alta concentração de sal (7-8%), já que o sal no meio reduz a água livre disponível para a bactéria, impactando o equilíbrio osmótico intra e extracelular.

Em contrapartida, *L. monocytogenes* conseguiu se multiplicar, após 72h, em  $A_w < 0,90$ , como observado no ensaio 14 que possuía  $A_w$  de 0,89 e, na Figura 6B. Também é importante ressaltar que a bactéria se multiplicou bem em concentrações altas de NaCl, cerca de 5%, confirmando sua característica de halotolerância. Além disso, o maior tempo de incubação (72h) pode ter favorecido a resposta adaptativa. Tal fato pode estar, dentre outros fatores, relacionado a sua capacidade de ganhar ou recuperar a pressão de turgescência por meio de um processo osmorregulador (GEORGET et al., 2015). Isto inclui uma etapa inicial de detecção, uma etapa de tradução na qual uma resposta é desencadeada, seguida por uma etapa de acomodação fisiológica e, eventualmente, crescimento. É um mecanismo acompanhado pelo acúmulo de solutos compatíveis (ex.: prolina, betaína, trealose) para se adaptar a baixa  $A_w$  e alta concentração de sal, em concentrações que contrabalançam a osmolaridade do meio externo. Estes solutos podem ser transportados do ambiente (ex.: alimentos) ou sintetizados no citoplasma (Barbosa-Cánovas et al., 2020; Troller, 2017). Outro mecanismo das bactérias para sobreviver em estresse osmótico é a adaptação da composição da membrana, aumentando os fosfolípidos e preservando a bicamada lipídica (Barbosa-Cánovas et al., 2020).

Serra-Castelló et al., (2020), também relataram maior inativação de *L. monocytogenes* em temperatura ambiente e menor  $A_w$  em presuntos serranos e ibéricos. As características do produto e, principalmente a  $A_w$  não permitiram o crescimento do patógeno. Além disso, o declínio foi mais pronunciado em torno da temperatura ambiente. Uma explicação geral para este comportamento é a de que o microrganismo morre mais rapidamente se a temperatura de conservação do produto estiver próxima do limiar de crescimento, como neste caso, a temperatura ambiente (Leistner, 2000).

Conforme observado, na maioria dos ensaios houve uma redução significativa das contagens durante os tempos analisados, porém, com sobrevivência da bactéria. A magnitude do seu comportamento variou significativamente de acordo com os parâmetros estudados. A interação entre  $A_w$  e NaCl, conforme esperado ditaram o

comportamento deste microrganismo. Combinando estes dois fatores, de uma forma geral, a análise estatística dos dados demonstra que em concentração maior de NaCl (cerca de 7-8%) e  $A_w$  menor ( $<0,89$ ), favoreceu sua redução, em comparação com o inverso dos parâmetros citados.

Ao longo do tempo estudado, *Listeria monocytogenes* atingiu sua maior multiplicação e redução na mesma temperatura, cerca de 25°C, comprovando a não significância deste fator à medida que o tempo de incubação foi aumentado. Tal fato pode estar associado à sua característica psicrófila. Apesar de ter tido reduções em baixas temperaturas, estas não foram o suficiente para sua inativação, não tendo reduções acentuadas. Isto indica que a refrigeração desacelerou as reações metabólicas evitando a exaustão metabólica das células. Além disso, é possível observar que à medida que o tempo de incubação aumentou, a multiplicação de *Listeria* se deu cada vez em temperaturas menores ( $<10^\circ\text{C}$ ) em alta  $A_w$  (Figuras 4, 5 e 6). É importante ressaltar que a refrigeração pode inibir outros microrganismos que não são psicrófilos, favorecendo *Listeria monocytogenes* devido a menor competição.

Sendo *L. monocytogenes* um patógeno psicrófilo, sua capacidade de se adaptar em baixas temperaturas é fundamental para atingir a dose infecciosa, que ainda não é bem compreendida (Buchanan et al., 2017), em alimentos refrigerados contaminados. Essa capacidade é uma preocupação para a saúde pública. Um dos principais sensores e reguladores para adaptação ao frio em *L. monocytogenes*, são as proteínas do choque frio (Csp) e de aclimação ao frio (Cap), estas funcionam como um acompanhante molecular, permitindo a replicação, transcrição e tradução em baixas temperaturas. Esta bactéria possui as proteínas CspA, CspB e CspD nas respostas de adaptação ao estresse frio e osmótico (Muchaamba et al., 2021; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2021).

Outro mecanismo de resposta ao estresse pelo frio envolve osmólitos e crioprotetores (Angelidis; Smith, 2003; Bayles; Wilkinson, 2000). Os solutos compatíveis, além de seu papel como osmoprotetores também têm sido implicados na criotolerância. Betaína e carnitina se acumulam em níveis mais elevados em *L. monocytogenes* quando este organismo é cultivado em temperaturas de refrigeração (Bayles; Wilkinson, 2000; O'Byrne; Booth, 2002). Em *L. monocytogenes* a betaína também tem efeito na fluidez da membrana. Células cultivadas a 5 °C na presença de

betaína mostram um pequeno aumento nos lipídios anteiso-C 15:0, e esses lipídios são conhecidos por desempenharem um papel importante na fluidez da membrana neste patógeno (Annous et al., 1997; O'Byrne; Booth, 2002). Manter a fluidez da membrana alterando o conteúdo e a composição dos ácidos graxos da membrana ou, encurtar o comprimento da cadeia de ácidos graxos é mais um dos mecanismos dessa bactéria para sobreviver em baixas temperaturas (Gao et al., 2023).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Socol, este produto deve possuir  $A_w$  de 0,90 e mínimo de 2,5% de sal (Espírito Santo, 2019). No presente estudo, a concentração de cloreto de sódio de 12 peças de 4 diferentes produtores, variou de 4 a 8%. Habitualmente, o Socol é produzido na região Serrana do estado do ES nas estações do verão ( $22,2 \pm 1$  °C) e inverno ( $17,5 \pm 1$  °C) (Instituto Nacional de Meteorologia, 2023). Portanto, tem condições de produção, maturação e comercialização variáveis. Em 0,90 de  $A_w$ , como descreve o RTIQ do Socol, *Listeria* conseguiu se multiplicar em cerca de 22 °C (Figura 6B). Considerando as condições variáveis de produção do Socol e os resultados obtidos no presente estudo, fica claro a capacidade de *Listeria monocytogenes* sobreviver em algumas etapas de produção em que encontra baixas temperaturas, baixa ou moderada concentrações de sal (2-5%) e alta  $A_w$  ( $>0,90$ ).

Órgãos como a Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca (SEAG) e o Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF) demandam informações para aprimoramento da cadeia produtiva, visando a segurança deste alimento. Principalmente acerca da possível refrigeração de toda a produção do Socol.

O presente estudo demonstrou que, ao decorrer do tempo, em temperaturas acima de 13°C e em  $A_w > 0,92$  *Listeria monocytogenes* é capaz de se multiplicar. Ainda que encontre obstáculos, como a baixa  $A_w$  no Socol pronto, a bactéria não foi inativada durante o tempo máximo estudado, nas médias de temperaturas de verão e inverno citadas. Constatando que apesar de não se multiplicar nas condições encontradas no produto, consegue sobreviver, com baixa redução. Além disso, a contaminação de ambientes de processamento de carnes (Meloni et al., 2014; Pérez-Baltar et al., 2021), pode representar um fator de risco para contaminação no processamento inicial deste produto, aumentando as chances de sobrevivência deste patógeno e o risco microbiológico.

### 3.3. Inativação de *L. monocytogenes* em FGS

Nesta etapa foi investigada a sobrevivência de *L. monocytogenes* em FGS após exposição de 72h ao SMS. Os resultados revelaram uma sensibilidade da bactéria, com completa inativação durante a exposição ao FGS em todos os ensaios testados, tendo sua contagem abaixo do limite de detecção da técnica de contagem em placas (1 log UFC/cm<sup>2</sup>). Samara e Koutsoumanis (2009) observaram redução de *L. monocytogenes* inoculada em alface por 48h com diferentes tratamentos de ácidos a 5°C e 20°C com as contagens atingindo o limite de detecção após 2h de exposição a 5°C e após 3h a 20°C.

Alguns fatores podem estar associados a essa inativação. Entre eles, o fato da *Listeria monocytogenes* utilizada ser a ATCC 7644, isolada de humanos. Foi demonstrado que a cepa com mesmo perfil de eletroforese em gel de campo pulsado de duas estirpes isoladas de casos clínicos de listeriose foi a mais sensível ao trato gastrointestinal simulado comparada a isoladas de queijos, sendo reduzida a valores abaixo do limite de detecção (Barbosa et al., 2012). O acúmulo de lesões (ocasionado pela composição do SMS e o pH baixo no FGS podem culminar na morte celular ou deixa-las incapazes de formar colônias no ágar seletivo (Barmpalia-Davis et al., 2009; Smet et al., 2016). A bactéria pode ter perdido o plasmídeo durante o armazenamento e frequente ativação para uso, que abriga o gene de tolerância ao estresse ácido, uma vez que o plasmídeo confere tolerância significativamente melhorada ao ácido (Hingston et al., 2017). Além disso, há relatos de taxas mais altas de abrigo de plasmídeos terem sido encontradas entre isolados alimentares e ambientais em comparação com isolados clínicos (Lebrun et al., 1992).

Embora este estudo tenha mostrado que a pré-exposição ao estresse osmótico não conferiu resistência às condições do trato gastrointestinal, é necessário reconhecer que essas células representam um risco potencial à segurança do Socol. As células podem estar danificadas, sem a possibilidade de serem cultivadas em meios de cultura, mas podem sobreviver e continuarem sua atividade metabólica, causando doenças (Cunningham; O'Byrne; Oliver, 2009; Truchado et al., 2023; Zolfaghari et al., 2020).

#### 4. CONCLUSÃO

O presente estudo reforça a necessidade do controle da Aw em carnes curadas a seco e maturadas. Maiores valores de atividade de água favorecem a multiplicação e menor redução de *L. monocytogenes* no SMS. Além disso, a bactéria estudada demonstrou capacidade de sobreviver por 72 horas em condições de produção e comercialização de Socol, o que representa um risco a segurança do produto.

É necessário o controle rigoroso das condições higiênicas adequadas, da qualidade da matéria-prima, ingredientes e insumos e adoção de boas práticas de fabricação. De acordo com as exigências da legislação sanitária são medidas preventivas simples, efetivas e pouco onerosas que mitigam o risco de contaminação microbiológica durante o processamento do Socol.

Embora *L. monocytogenes* não tenha demonstrado capacidade de sobrevivência ao fluido gástrico simulado, há a possibilidade de sua presença em números não detectáveis durante a passagem pelo trato gastrointestinal humano.

#### REFERÊNCIAS

- Alves, Â., Magalhães, R., Brandão, T.R.S., Pimentel, L., Rodríguez-Alcalá, L.M., Teixeira, P., Ferreira, V., 2020. Impact of exposure to cold and cold-osmotic stresses on virulence-associated characteristics of *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiol* 87, 103351. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2019.103351>
- Angelidis, A.S., Smith, G.M., 2003. Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress. *Appl Environ Microbiol* 69. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1013-1022.2003>
- Annous, B.A., Becker, L.A., Bayles, D.O., Labeda, D.P., Wilkinson, B.J., 1997. Critical Role of Anteiso-C 15:0 Fatty Acid in the Growth of *Listeria monocytogenes* at Low Temperatures, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*.
- Baranyi, J., Pin, C., Ross, T., 1999. Validating and comparing predictive models. *Int J Food Microbiol* 48. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00035-5)
- Barbosa, J., Borges, S., Magalhães, R., Ferreira, V., Santos, I., Silva, J., Almeida, G., Gibbs, P., Teixeira, P., 2012. Behaviour of *Listeria monocytogenes* isolates through gastrointestinal tract passage simulation, before and after two sub-lethal stresses. *Food Microbiol* 30. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.001>
- Barbosa-Cánovas, G. V., Fontana, A.J., Schmidt, S.J., Labuza, T.P., 2020. Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications, *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. <https://doi.org/10.1002/9781118765982>

- Barmpalia-Davis, I.M., Geornaras, I., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2009. Effect of fat content on survival of *Listeria monocytogenes* during simulated digestion of inoculated beef frankfurters stored at 7 °C. *Food Microbiol* 26. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.02.011>
- Bayles, D.O., Wilkinson, B.J., 2000. Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* 30. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00646.x>
- Beales, N., 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 3. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x>
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Aymerich, T., Garriga, M., 2015. Modeling the protective effect of aw and fat content on the high pressure resistance of *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham. *Food Research International* 75. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.052>
- Buchanan, R.L., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C., Whiting, R.C., 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>
- Cava, R., Higuero, N., Ladero, L., 2021. High-pressure processing and storage temperature on *Listeria monocytogenes*, microbial counts and oxidative changes of two traditional dry-cured meat products. *Meat Sci* 171. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108273>
- Cavalcanti, A.A.C., Limeira, C.H., Siqueira, I.N. de, Lima, A.C. de, Medeiros, F.J.P. de, Souza, J.G. de, Medeiros, N.G. de A., Oliveira Filho, A.A. de, Melo, M.A. de, 2022. The prevalence of *Listeria monocytogenes* in meat products in Brazil: A systematic literature review and meta-analysis. *Res Vet Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.02.015>
- Chihib, N.E., Ribeiro Da Silva, M., Delattre, G., Laroche, M., Federighi, M., 2003. Different cellular fatty acid pattern behaviours of two strains of *Listeria monocytogenes* Scott A and CNL 895807 under different temperature and salinity conditions. *FEMS Microbiol Lett* 218. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01116-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01116-3)
- Claxton, M.L., Hudson, L.K., Bryan, D.W., Denes, T.G., 2023. Soil Collected from a Single Great Smoky Mountains Trail Contains a Diversity of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. . *Microbiol Spectr* 11. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01431-22>
- Cunningham, E., O'Byrne, C., Oliver, J.D., 2009. Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: Evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH. *Food Control* 20. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.03.005>
- Damodaran, S., Parkin, K.L., 2018. *Química de Alimentos de Fennema, Química de Alimentos de Fennema*.
- D'Arrigo, M., Mateo-Vivaracho, L., Guillamón, E., Fernández-León, M.F., Bravo, D., Peirotn, Á., Medina, M., García-Lafuente, A., 2020. Characterization of persistent *Listeria monocytogenes* strains from ten dry-cured ham processing facilities. *Food Microbiol* 92, 103581. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2020.103581>
- Delignette-Muller, M.L., Rosso, L., Flandrois, J.P., 1995. Accuracy of microbial growth predictions with square root and polynomial models. *Int J Food Microbiol* 27. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00158-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00158-3)

- Edgcomb, M.R., Sirimanne, S., Wilkinson, B.J., Drouin, P., Morse, R., 2000. Electron paramagnetic resonance studies of the membrane fluidity of the foodborne pathogenic psychrotroph *Listeria monocytogenes*. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1463. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00179-0)
- Espírito Santo, 2019. Portaria nº 044-R, de 21 de novembro de 2019. Diário Oficial dos poderes do estado, Edição 25115, p. 80, Brazil.
- European Food Safety Authority, 2023. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 21. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>
- Farber, J.M., Coates, F., Daley, E., 1992. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* 15. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1992.tb00737.x>
- Freitas, J.F. de, Vinha, M.B., Simões, A.A.N., Amano, L.M., 2021. SOCOL: A INDICAÇÃO GEOGRÁFICA COMO PROMOTORA DE AVANÇOS NA LEGISLAÇÃO SANITÁRIA. *Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural* 11, 38–48. <https://doi.org/10.54682/ier.v11e12-p38-48>
- Gahan, C.G.M., Hill, C., 2005. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection, in: *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02559.x>
- Gao, X., Liu, H., Wang, T., Jiang, Z., Zhu, Y., 2023. Low temperature preservation for perishable ready to eat foods: Not entirely effective for control of *L. monocytogenes*. *Trends Food Sci Technol* 142, 104228. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2023.104228>
- Georget, E., Sevenich, R., Reineke, K., Mathys, A., Heinz, V., Callanan, M., Rauh, C., Knorr, D., 2015. Inactivation of microorganisms by high isostatic pressure processing in complex matrices: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.10.015>
- Granato, D., de Araújo Calado, V.Ô.M., Jarvis, B., 2014. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.024>
- Gutierrez, C., Abee, T., Booth, I.R., 1995. Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. *Int J Food Microbiol* 28. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00059-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00059-3)
- Hingston, P., Chen, J., Dhillon, B.K., Laing, C., Bertelli, C., Gannon, V., Tasara, T., Allen, K., Brinkman, F.S.L., Hansen, L.T., Wang, S., 2017. Genotypes associated with *Listeria monocytogenes* isolates displaying impaired or enhanced tolerances to cold, salt, acid, or desiccation stress. *Front Microbiol* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00369>
- Instituto Adolfo Lutz, 2008. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, Instituto Adolfo Lutz.
- Instituto Nacional de Meteorologia, 2023. Tabela de dados das estações [WWW Document]. URL <https://tempo.inmet.gov.br/TabelaEstacoes/A001> (accessed 2.15.24).
- Kayode, A.J., Semerjian, L., Osaili, T., Olapade, O., Okoh, A.I., 2021. Occurrence of Multidrug-Resistant *Listeria monocytogenes* in Environmental Waters: A Menace of

Environmental and Public Health Concern. *Front Environ Sci* 9. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.737435>

- 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 Microbiol* 21. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.11.003>
- Lebrun, M., Loulergue, J., Chaslus-Dancla, E., Audurier, A., 1992. Plasmids in *Listeria monocytogenes* in relation to cadmium resistance. *Appl Environ Microbiol*. <https://doi.org/10.1128/aem.58.9.3183-3186.1992>
- Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology, in: *International Journal of Food Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00161-6)
- Ly, V., Parreira, V.R., Farber, J.M., 2019. Current understanding and perspectives on *Listeria monocytogenes* in low-moisture foods. *Curr Opin Food Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.012>
- Magalhães, R., Ferreira, V., Brandão, T. R., Palencia, R. C., Almeida, G., Teixeira, P. 2016. Persistent and non-persistent strains of *Listeria monocytogenes*: A focus on growth kinetics under different temperature, salt, and pH conditions and their sensitivity to sanitizers. *Food microbiology*, 57, 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.02.005>
- Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, C., Blom-Hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., Else, T., Visser, D., Dalgaard, P., 2010. Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes* — An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. *Int J Food Microbiol* 141, 137–150. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.04.026>
- Meloni, D., Consolati, S.G., Mazza, R., Mureddu, A., Fois, F., Piras, F., Mazzette, R., 2014. Presence and molecular characterization of the major serovars of *Listeria monocytogenes* in ten Sardinian fermented sausage processing plants. *Meat Sci* 97. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.02.012>
- Muchaamba, F., Stephan, R., Tasara, T., 2021. *Listeria monocytogenes* cold shock proteins: Small proteins with a huge impact. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051061>
- Mutz, Y.S., Rosario, D.K.A., Castro, V.S., Bernardes, P.C., Paschoalin, V.M.F., Conte-Junior, C.A., 2019. Prior exposure to dry-cured meat promotes resistance to simulated gastric fluid in salmonella typhimurium. *Foods* 8. <https://doi.org/10.3390/foods8120603>
- O'Byrne, C.P., Booth, I.R., 2002. Osmoregulation and its importance to food-borne microorganisms. *Int J Food Microbiol* 74. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00681-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00681-X)
- Oscar, T.P., 2005. Validation of lag time and growth rate models for *Salmonella* Typhimurium: Acceptable prediction zone method. *J Food Sci* 70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07103.x>
- Pérez-Baltar, A., Pérez-Boto, D., Medina, M., Montiel, R., 2021. Genomic diversity and characterization of *Listeria monocytogenes* from dry-cured ham processing plants. *Food Microbiol* 99. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103779>

- Ross, T., 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03539.x>
- Ross, T., Dalgaard, P., Tienungoon, S., 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int J Food Microbiol* 62. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00340-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00340-8)
- Samara, A., Koutsoumanis, K.P., 2009. Effect of treating lettuce surfaces with acidulants on the behaviour of *Listeria monocytogenes* during storage at 5 and 20 °C and subsequent exposure to simulated gastric fluid. *Int J Food Microbiol* 129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.023>
- Sampedro, F., Pérez-Rodríguez, F., Servadio, J.L., Gummalla, S., Hedberg, C.W., 2022. Quantitative risk assessment model to investigate the public health impact of varying *Listeria monocytogenes* allowable levels in different food commodities: A retrospective analysis. *Int J Food Microbiol* 383. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109932>
- Schäfer, D.F., Steffens, J., Barbosa, J., Zeni, J., Paroul, N., Valduga, E., Junges, A., Backes, G.T., Cansian, R.L., 2017. Monitoring of contamination sources of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse. *LWT* 86. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.024>
- Schoder, D., 2015. *Listeria*: Listeriosis, in: *Encyclopedia of Food and Health*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00425-6>
- Serra-Castelló, C., Jofré, A., Garriga, M., Bover-Cid, S., 2020. Modeling and designing a *Listeria monocytogenes* control strategy for dry-cured ham taking advantage of water activity and storage temperature. *Meat Sci* 165. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108131>
- Smet, C., Noriega, E., Rosier, F., Walsh, J.L., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F., 2016. Influence of food intrinsic factors on the inactivation efficacy of cold atmospheric plasma: Impact of osmotic stress, suboptimal pH and food structure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 38. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.028>
- Smith, E.P., Rose, K.A., 1995. Model goodness-of-fit analysis using regression and related techniques. *Ecol Modell* 77. [https://doi.org/10.1016/0304-3800\(93\)E0074-D](https://doi.org/10.1016/0304-3800(93)E0074-D)
- Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P., 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect*. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.011>
- Te Giffel, M.C., Zwietering, M.H., 1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 46. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00189-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00189-5)
- Troller, J.A., 2017. Adaptation and growth of microorganisms in environments with reduced water activity, in: *Water Activity: Theory and Applications to Food*. <https://doi.org/10.1201/9780203734148>
- Truchado, P., Gómez-Galindo, M., Gil, M.I., Allende, A., 2023. Cross-contamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in the viable but non-culturable (VBNC) state during washing of leafy greens and the revival during shelf-life. *Food Microbiol* 109. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104155>

Wiktorczyk-Kapischke, N., Skowron, K., Grudlewska-Buda, K., Walecka-Zacharska, E., Korkus, J., Gospodarek-Komkowska, E., 2021. Adaptive Response of *Listeria monocytogenes* to the Stress Factors in the Food Processing Environment. Front Microbiol. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.710085>

Zolfaghari, M., Rezaei, M., Mohabbati Mobarez, A., Forozandeh Moghaddam, M., Hosseini, H., Khezri, M., 2020. Virulence genes expression in viable but non-culturable state of *Listeria monocytogenes* in fish meat. Food Science and Technology International 26. <https://doi.org/10.1177/1082013219877267>.

## 5. CONCLUSÃO

A análise estatística detalhada revelou a alta precisão do modelo para ajuste da atividade de água utilizando cloreto de sódio e glicerol, proporcionando previsões confiáveis e um ajuste praticamente perfeito dos dados.

Ficou evidenciada a importância da atividade de água na sobrevivência e multiplicação de *L. monocytogenes* em Socol. A observação de que maiores níveis de atividade de água, aliado a concentrações consideradas alta de NaCl aumentam as chances de sobrevivência e multiplicação dessa bactéria, além da capacidade de sobreviver por período prolongado, ressalta a necessidade de medidas rigorosas de controle de contaminação durante a produção e o armazenamento de carnes curadas a seco, como o Socol, para prevenir a contaminação microbiológica. Nesse sentido, a implementação de boas práticas de fabricação e medidas preventivas de contaminação, conforme recomendado pelas autoridades sanitárias, é essencial para mitigar potenciais riscos.

Embora *Listeria monocytogenes* não tenha demonstrado capacidade de sobrevivência ao fluido gástrico simulado, há possibilidade de sua presença em números não detectáveis durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Novas investigações utilizando cepas isoladas de produtos cárneos e técnicas sensíveis para detectar células viáveis não cultiváveis são necessárias para uma compreensão mais abrangente dos riscos associados à presença desse patógeno em produtos como o Socol.