



**Universidade de
Aveiro**
Ano (2020)

Mónica Raquel do Vale Rodrigues **Comportamento bacteriano ao longo do processo de descongelação de alimentos**



**Universidade de
Aveiro**

Ano (2020)

Mónica Raquel do Vale Rodrigues **Comportamento bacteriano ao longo do processo de descongelação de alimentos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Adelaide Almeida, Professora auxiliar com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

Presidente	Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso Professora Auxiliar c/ Agregação da Universidade de Aveiro
Arguente	Prof. Doutora Cláudia Sofia Soares de Oliveira Professora Auxiliar c/ Agregação da Universidade de Aveiro
Orientadora	Prof. Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida Professora Auxiliar c/ Agregação da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço a todos os membros do laboratório de microbiologia da empresa ALS Controlvet pelo apoio no trabalho laboratorial, sem eles este projeto não teria sido desenvolvido, destaco a Dr. Elisa Maia pelo seu papel fundamental.

Gostaria de deixar uma nota especial à professora Dr. Adelaide Almeida pelo acompanhamento regular e pela sua disponibilidade.

À minha mãe e ao Mário por serem um dos pilares fundamentais da minha vida, sem eles não estaria aqui hoje.

À minha irmã por ser a minha pessoa, é um privilégio ter-te comigo.

Ao meu pai pelo apoio do meu percurso académico.

À minha tia pelo interesse e apoio no meu desenvolvimento escolar.

Aos meus colegas de mestrado por me acompanharem nesta fase, em especial à Eduarda e Susana por serem uma ajuda fundamental neste processo.

À Ana, Carolina, Ivana e Marina por serem uma presença diária e as amigas de uma vida.

Aos membros da casa do Breiner, Bia, Carlota, Carolina, Marina e Tiago pelas memórias que vão para sempre deixar saudade.

palavras-chave

Comportamento bacteriano, alimentos congelados, congelação/descongelação, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, infecções alimentares, segurança alimentar

resumo

O presente trabalho foi desenvolvido na empresa ALS Controlvet, especializada em análises microbiológica, imunológica e química de alimentos e águas. O estudo foi desenvolvido no laboratório de microbiologia e, devido a uma elevada distribuição geográfica de clientes, a instituição deparou-se com a dificuldade de transporte de amostras alimentares congeladas no trajeto cliente – empresa, a -18 °C. O objetivo deste trabalho é definir um valor de temperatura alternativo que seja conveniente para a empresa e que assegure, em simultâneo, que os teores bacterianos das amostras não se alterem significativamente ao longo do processo de transporte. Para cumprir o objetivo, amostras alimentares foram contaminadas com as seguintes espécies: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*. De seguida, foram submetidos a um procedimento de congelação durante um período que variou entre 3 a 20 dias. A análise do comportamento bacteriano foi avaliada segundo diferentes condições. Numa fase inicial, o processo de descongelação ocorreu a temperatura ambiente (18 - 25 °C) durante 9 horas com periodicidade de análise de 2 horas. Numa segunda fase foram selecionados valores de temperatura de refrigeração (1,5 e 4 °C) ao longo de 96 horas com análise microbiológica a cada período de 24 horas. O comportamento bacteriano variou consoante o valor de temperatura de descongelação, a espécie bacteriana e o alimento. Os resultados não permitiram definir o valor requerido, no entanto, de um modo geral, a descongelação de alimentos a 1,5 ou 4 °C durante 48 horas não provocou alterações significativas na densidade bacteriana da maioria dos géneros alimentares considerados.

keywords

Bacterial behaviour, frozen foods, freezing/thawing, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, food infection, food safety

abstract

The present work was developed in ALS Controlvet, specialized in microbial, immunological, and chemical food and water analyses. Due to a highly dispersed field of client network, the institution has faced an issue with frozen food transport, at a temperature of (- 18 °C) from client to the company facilities. The study goal was to define an alternative temperature value which would be convenient to the company, ensuring microbial maintenance so that the analyses can be done correctly. In order to solve the problem, food was contaminated with the following species: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*. Then, they were submitted to a freezing process for 3 to 20 days. The bacterial behaviour analyses were done by submitting the microbial species to different thawing temperature values. On an initial stage, the thawing process occurred at ambient temperature (18 to 25 °C) for 9 hours with period analysis of 2 hours. On a second phase, refrigeration temperature values (1,5 or 4 °C) through 96 hours were used. The bacterial behaviour switched with thawing temperature value, bacterial species and food. The obtained results did not allow to define a temperature value, however, the used value of 1,5 or 4 °C for 48 hours in a food thawing in most cases didn't make significant alterations on bacterial density.

Índice

Lista de gráficos	2
Lista de tabelas	4
Lista de figuras	5
Objetivo	6
Introdução	7
1. Tóxicos/infeções alimentares	7
2. Alimentos congelados	7
3. Bactérias patogénicas	9
3.1. <i>Escherichia coli</i>	9
3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
3.3. <i>Bacillus cereus</i>	10
3.4. <i>Salmonella</i>	10
3.5. <i>Listeria</i> spp	11
3.6. <i>Campylobacter jejuni</i>	12
3.7. <i>Clostridium</i> spp	12
4. Efeitos do processo de congelação no comportamento bacteriano	13
5. Efeitos do processo de descongelação no comportamento bacteriano	15
6. Microbiologia preditiva	16
Material e Métodos	18
1.1 Preparação do stock bacteriano	18
1.2 Contagem unidades formadoras de colónias (UFC)	18
1.3 Contaminação do alimento	18
1.4 Análise das amostras alimentares	22
1.5 Contagens	23
Resultados e Discussão	25
1.1 Peru	25
1.2 Frango	26
1.3 Carne vermelha	26
1.4 Mistura de vegetais	27
1.5 Couve-de-bruxelas	28

1.6 Cogumelos	28
1.7 Salmão	29
1.8 Marisco	30
1.9 Lulas	31
2.1. Peru	34
2.2 Frango	36
2.3. Carne vermelha	38
2.4. Mistura de vegetais	40
2.5. Batatas	43
2.6. Cogumelos	45
2.7. Camarão	47
2.8. Lulas	50
2.9. Pescado	52
Conclusão	58
Referências bibliográficas	59
Anexos	64

Lista de gráficos

Gráfico 1. Crescimento de <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> em Peru ao longo de um período de 9 horas a temperatura ambiente (18 – 25 °C)	25
Gráfico 2. Crescimento de <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> em Frango ao longo de um período de 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C)	26
Gráfico 3. Crescimento de <i>E. coli</i> e <i>L. monocytogenes</i> em Carne vermelha ao longo de um período de 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C)	27
Gráfico 4. Crescimento de <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> em Mistura de vegetais ao longo de um período de 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C)	27
Gráfico 5. Crescimento de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> em Couve-de-bruxelas ao longo de um período de 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C)	28
Gráfico 6. Crescimento de <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> em Cogumelos ao longo de um período de 9 horas a temperatura ambiente (18 – 25 °C)	29
Gráfico 7. Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> em Salmão ao longo de um período de 9 horas a temperatura ambiente (18 – 25 °C)	30
Gráfico 8. Crescimento de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> em Marisco ao longo de um período de 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C)	30
Gráfico 9. Crescimento de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> em Lulas ao longo de um período de 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C)	31
Gráfico 10. Crescimento de <i>S. aureus</i> em Peru ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação a 1,5 e 4 °C	34
Gráfico 11. Crescimento de <i>E. coli</i> em Peru ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	35
Gráfico 12. Crescimento de <i>E. coli</i> em Peru ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	35
Gráfico 13. Crescimento de <i>S. aureus</i> em Frango ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	36
Gráfico 14. Crescimento de <i>E. coli</i> em Frango ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	37
Gráfico 15. Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em Frango ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	38
Gráfico 16. Crescimento de <i>S. aureus</i> em Carne vermelha ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	38
Gráfico 17. Crescimento de <i>E. coli</i> em Carne vermelha ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	39
Gráfico 18. Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em Carne vermelha ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	40
Gráfico 19. Crescimento de <i>S. aureus</i> em Mistura de vegetais ao longo de um período de 96 horas a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	41
Gráfico 20. Crescimento de <i>E. coli</i> em Mistura de vegetais ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	42

Gráfico 21. Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em Mistura de vegetais ao longo de um período de 96 horas a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	43
Gráfico 22. Crescimento de <i>S. aureus</i> em Batatas ao longo de um período de 96 horas a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	43
Gráfico 23. Crescimento de <i>E. coli</i> em Batatas ao longo de um período de 96 horas a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	44
Gráfico 24. Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em Batatas ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	45
Gráfico 25. Crescimento de <i>S. aureus</i> em Cogumelos ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	46
Gráfico 26. Crescimento de <i>S. aureus</i> em Cogumelos ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	46
Gráfico 27. Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em Cogumelos ao longo de um período de 99 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	47
Gráfico 28. Crescimento de <i>S. aureus</i> em Camarão ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	48
Gráfico 29. Crescimento de <i>E. coli</i> em Camarão ao longo de um período de 96 horas a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	48
Gráfico 30. Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em Camarão ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	49
Gráfico 31. Crescimento de <i>S. aureus</i> em Lulas ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 °C e 4 °C	50
Gráfico 32. Crescimento de <i>E. coli</i> em Lulas ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	51
Gráfico 33. Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em Lulas ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C	51
Gráfico 34. Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em Pescado ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 °C	52
Gráfico 35. Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em Pescado ao longo de um período de 96 horas, a temperatura de descongelação 1,5 °C	52

Lista de tabelas

Tabela 1. Lista das amostras alimentares contaminadas com espécies bacterianas e, respetivo tempo de congelação e temperatura e tempo de descongelação	18
Tabela 2. Lista do meio de cultura para quantificação dos microrganismos inoculados nos alimentos e respetiva temperatura e período de incubação	23
Tabela 3. Comportamento de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>L. monocytogenes</i> ao longo do processo de descongelação a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 9 horas em diversos alimentos	31
Tabela 4. Comportamento de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>L. monocytogenes</i> ao longo do processo de descongelação a temperatura de refrigeração (1,5 e 4 °C) durante 96 horas em diversos alimentos	52

Lista de figuras

Figura 1. Esquema do procedimento prático desenvolvido	24
--	----

Objetivo

O presente trabalho foi desenvolvido na empresa ALS Controlvet, especializada em análises microbiológica, imunológica e química de alimentos e águas, encontrando-se este estudo inserido no laboratório de microbiologia. A instituição deparou-se com a dificuldade de transporte de amostras alimentares congeladas no trajeto cliente – local de análise, à temperatura de (-18 °C), devido a uma elevada distribuição geográfica de pontos de recolha. O objetivo proposto foi definir um valor de temperatura alternativo que seja conveniente para a empresa e que assegure, em simultâneo, que os valores microbiológicos do produto para análise não se alterem significativamente.

Introdução

1. Tóxico/infeções alimentares

As infeções e intoxicações alimentares apresentam uma séria ameaça à saúde pública a nível mundial, uma vez que se encontram na origem de cerca de 600 milhões de doenças e de 42000 mortes por ano (Roberts, T., 2018). Os sintomas resultantes de uma infeção ou de uma intoxicação alimentar são muito variados podendo manifestar-se como uma simples dor abdominal, o que resulta frequentemente em casos não reportados, ou apresentar um carácter mais grave, podendo até conduzir à morte (Bhunia, 2018). As referidas doenças para além da sintomatologia gerada no seu decorrer podem originar repercussões a longo prazo como a síndrome do intestino irritável, artrite reativa, diabetes, hipertensão, doenças renais, disfunções neurológicas, entre outras (Roberts, T., 2018). Os grupos mais afetados são pessoas com idade avançada, grávidas, pacientes imunodeficientes, crianças e bebés, sendo estes últimos particularmente sensíveis representando 40% dos casos e um terço de todas as mortes (Bintsis, 2017). Associado às consequências na saúde humana provocadas por estas infeções e intoxicações, encontra-se o impacto económico que é bastante significativo devido a perda de produto, na eventualidade de este se encontrar contaminado, e perda de mão-de-obra, no caso de o trabalhador ser o lesado pela doença (Bhunia, 2018). As repercussões serão também expressas em outros componentes, como por exemplo, a confiança dos consumidores em produtos provenientes de empresas envolvidas anteriormente em contaminações alimentares (Bhunia, 2018). Por norma, estes fenómenos têm um impacto económico ainda mais significativo que os restantes efeitos aqui descritos, uma vez que uma menor confiança leva a um menor consumo e, conseqüentemente é gerado um menor lucro pela empresa (Bhunia, 2018). A partir daqui inicia-se um efeito cíclico, na medida em que, manter a qualidade dos produtos torna-se algo cada vez mais difícil devido à falta de meios financeiros (Roberts, T.; 2018). Um estudo de 2011 demonstrou que 77% dos membros da indústria que tinham experienciado contaminações microbiológicas nos seus produtos nos 5 anos anteriores estimaram que os seus custos rondavam os \$30 milhões e 23% reportaram custos ainda mais elevados (Roberts, T, 2018). Mais de 81% dos inquiridos descreve as consequências financeiras como “significativas” ou “catastróficas” (Roberts, T.; 2018). Estes fenómenos reforçam a importância da manutenção da qualidade dos produtos alimentares surgindo, assim, uma necessidade acrescida de garantir a segurança microbiológica dos alimentos com o objetivo de defender empresas e consumidores (Roberts, T.; 2018).

2. Alimentos congelados

A indústria dos alimentos congelados tem vindo a aumentar ao longo dos últimos anos, como consequência de uma adoção generalizada por parte da população de um estilo de vida mais agitado (Hossain-Jany et al, 2016). A globalização é também um grande fator contribuinte para uma maior necessidade de produtos congelados, especialmente de carne e pescado, de modo a que o transporte dos mesmos seja possível durante longos períodos (Bavaro, 2012). O uso de baixas temperaturas pode reduzir ou eventualmente inativar

células microbianas, no entanto, a grande maioria consegue resistir a estas condições (Bavaro, 2012). Por norma, os microrganismos patogénicos não se multiplicam a temperaturas negativas o que se deve ao facto de as suas enzimas não possuírem adaptações necessárias às referidas condições ou devido a danos celulares causados pelo processo de congelação (Nabil et al, 2015). Este último efeito poderá afetar a capacidade de formação de colónias em meios seletivos gerando, assim, uma subestimação do número real de células nas amostras congeladas analisadas (Nabil et al, 2015). É de igual forma necessário considerar que diferentes alimentos têm recursos distintos que podem ser utilizados pelos microrganismos o que terá impacto nos surtos infecciosos alimentares que deste possam resultar (Nabil et al, 2015).

A maior parte dos casos de infeção alimentar com origem bacteriana em produtos como frutas e vegetais, são causados por *Escherichia coli* (Machado-Moreira et al, 2019). Este microrganismo encontra-se difundido no ambiente e, por norma, é encontrado em efluentes provenientes de quintas, e em material sujeito a contaminação fecal (Machado-Moreira et al, 2019). *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Bacillus* e *Listeria* são outros géneros identificados como relevantes em infeções provocadas pelo consumo de alimentos que, geralmente, não são sujeitos a procedimentos de cozedura (Machado-Moreira et al, 2019).

Uma elevada percentagem de surtos infecciosos e toxicoinfecciosos, com origem em produtos de carne, especialmente em carnes vermelhas, devem-se à presença de *E. coli* e *Salmonella*, resultantes, principalmente, de falhas em higienização e práticas incorretas durante a preparação destes produtos (Omer et al, 2018). Outros microrganismos também reportados neste género de doenças, embora com uma menor frequência são *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes* (Omer et al, 2018). No caso do consumo de carne de aves os dois principais patogénicos responsáveis por gastroenterite humana são *Salmonella* e *Campylobacter* (Rouger et al, 2017).

A expansão mundial da cozinha asiática levou ao aumento do consumo de pescado cru, uma vez que é algo característico nesta prática culinária (Novoslavskij et al, 2015). Como consequência, este produto tornou-se uma das principais causas de infeção ou intoxicação alimentar nesta categoria de alimentos (Novoslavskij et al, 2015). Os microrganismos patogénicos mais frequentes em pescado são *Vibrio spp.*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *C. botulinum*, e *Yersinia spp.* (Novoslavskij et al, 2015). Os agentes microbianos de maior preocupação no caso de marisco incluem norovírus, *Vibrio* e *Salmonella* (Elbashir et al, 2018).

Os cogumelos são também frequentemente comercializados congelados, e embora se encontrem maioritariamente associados a intoxicações provocadas por fungos e leveduras, o seu consumo pode estar na origem de infeções alimentares bacterianas, sendo que estas são, por norma, resultantes de contaminação proveniente do solo devido a contacto direto com este (Baumgardner, 2012). A literatura indica a presença de bactérias em cogumelos como *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *B. cereus*, *Clostridium tetani* e *C. botulinum* (Baumgardner, 2012).

3. Bactérias patogénicas

As infeções ou intoxicações alimentares são maioritariamente provocadas por bactérias, de acordo com a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar. Patogénicos como *Campylobacter*, *Salmonella*, *E. coli* e *L. monocytogenes* são responsáveis pela maioria dos surtos alimentares a nível global (Bintsis, 2017). Algumas espécies são capazes de produzir elementos que lhes conferem vantagem, como por exemplo, elevada resistência ao calor através da produção de esporos (*C. botulinum*, *C. perfringens*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*) e/ou produção de toxinas (*S. aureus*, *C. botulinum*) (Bintsis, 2017).

3.1. *Escherichia coli*

E. coli é um dos microrganismos mais extensivamente estudado e é muito utilizado pela comunidade científica em várias áreas, como a engenharia genética, investigação, entre outras (Jang et al, 2017). Esta bactéria apresenta-se sob a forma de bastonete, é de Gram negativo, anaeróbia facultativa e pertence à família *Enterobacteriaceae* (Jang et al, 2017). Desenvolve-se rapidamente quando se encontra perante condições ótimas de crescimento, conseguindo replicar-se num período de 20 minutos (Jang et al, 2017). Uma questão particular deste microrganismo, é o facto de ser um habitante natural do trato intestinal de animais de sangue quente o que dificulta a diferenciação de estirpes patogénicas de não patogénicas, sendo este processo de distinção dificultado pela semelhança de comportamento de ambos (Viazis et al, 2011). Associado ao facto de ser um habitante comum do trato gastrointestinal esta bactéria também é, por norma, encontrada em águas devido a contaminação fecal o que acaba por facilitar a contaminação de alimentos que contactem com esta, sendo exemplos mais frequentes a superfície de vegetais de folhas verdes (ex. espinafre e alface) (Jang et al, 2017). Na espécie *E. coli* é possível identificar diversas estirpes relevantes no âmbito de toxicoinfeções alimentares, nomeadamente, *E. coli* produtora da toxina shiga (STEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* aderente e enteroinvasiva (Jang et al, 2017). O conjunto bacteriano enumerado difere no grau de virulência e nos mecanismos de patogenicidade que vão originar problemas de saúde diversos, apresentando-se estes maioritariamente como perturbações no trato gastrointestinal (Jang et al, 2017).

Já foram observados diversos casos de infeção alimentar, com origem em produtos congelados contaminados com *E. coli*, tendo sido verificado que este microrganismo consegue manter-se viável até 9 meses em carne congelada de (-18 ° a -22 °C) (Gill et al, 2016).

3.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria que se apresenta sob a forma de coco, é de Gram positivo, anaeróbia facultativa e imóvel (Hao et al, 2015). Este microrganismo é considerado um patogénico alimentar relevante, uma vez que se apresenta como a terceira causa de

intoxicação alimentar a nível global, e adquire uma importância particular quando nos referimos a alimentos congelados, devido à sua elevada capacidade de sobrevivência por longos períodos nestas condições (Hao et al, 2015). *S. aureus* possui a capacidade de produção de enterotoxinas e, tendo sido até ao momento identificadas 9, sendo que as designadas por letras de A a D são responsáveis por uma parte considerável dos surtos alimentares descritos na literatura científica (Bintsis, 2017). Os sintomas causados por estas estirpes aparecem após 6 a 10 horas e incluem sintomas como vômitos, náuseas, dores abdominais, dores de cabeça, tonturas, arrepios, transpiração, fraqueza, dores musculares e diarreia (Bintsis, 2017).

S. aureus consegue sobreviver durante um longo período em locais caracterizados por baixa atividade de água, e já foi isolado do ar, poeira e água sendo um dos patogénicos não formador de esporos mais resistente (Bintsis, 2017). Este microrganismo pode ser encontrado em diferentes tipos de alimentos, como por exemplo, carne vermelha, peru, salmão, ostras, camarão, tartes, leite e saladas (Loir et al, 2003). Os humanos são também um reservatório de *S. aureus*, e a contaminação de alimentos pode ocorrer através de contacto direto, como fragmentos de pele, ou através de partículas provenientes do trato respiratório, sendo que a maioria das infeções alimentares provocadas por este microrganismo ocorre durante a preparação devido a refrigeração, cozedura, aquecimento não adequado, ou má higiene pessoal (Fetsch e Jöhler, 2018).

3.3. *Bacillus cereus*

B. cereus é uma bactéria de Gram positivo, móvel, ubíqua, produtora de esporos bastante relevante na área das intoxicações alimentares (Arnesen et al, 2008). O seu nicho ecológico primário é o solo e, a partir deste local os seus esporos são introduzidos em cereais, vegetação, pelo animal, água fresca e sedimentos pelo que alimentos como arroz, massa e vegetais são os géneros alimentares com maior probabilidade de contaminação por este microrganismo (Messelhauser, 2010). A capacidade de produção de esporos confere-lhe uma elevada resistência a procedimentos de cozedura, sendo particularmente relevante em situações de reaquecimento de refeições previamente cozinhadas, uma vez que nestas condições há uma dificuldade acrescida de atingir uma temperatura elevada o suficiente que permita a destruição destas estruturas (Englezos et al, 2010). Esta característica torna a bactéria relevante em alimentos cozinhados comercializados sob congelação (Englezos et al, 2010).

B. cereus possuiu a capacidade de produzir dois tipos de toxinas que originam doenças diferentes (Arnesen et al, 2008). Uma delas caracterizada por náuseas e vômitos e a segunda apresenta diarreia como principal sintoma (Arnesen et al, 2008). Em ambos os casos os efeitos físicos não ultrapassam a duração de 24 horas (Arnesen et al, 2008).

3.4. *Salmonella* spp.

Salmonella é um dos géneros bacterianos mais comum na origem de infeções alimentares e causa aproximadamente 1 milhão de infeções e 400 mortes por ano nos EUA (Hassan et al, 2019). Esta bactéria apresenta-se sob forma de bastonete, é anaeróbica facultativa, de

Gram negativo e é membro da família *Enterobacteriaceae* (Eng et al, 2015). A dose infecciosa é baixa, cerca de 0,01 UFC/g, pelo que a sua presença em alimentos é suficiente para considerar os alimentos impróprios para consumo (Catford et al, 2017). Os sintomas causados dependem da estirpe, do estado de saúde do hospedeiro e da quantidade de células ingeridas sendo as mais comuns, náuseas, dores abdominais, diarreia, vômitos e febre (Catford et al, 2017). A grande maioria das estirpes de *Salmonella* são patogénicas devido à sua capacidade de invasão, replicação e sobrevivência em células do hospedeiro humano (Eng et al, 2015). Alguns estudos têm apontado uma ligação entre doenças infecciosas provocada por *Salmonella* e problemas cancerígenos, podendo a bactéria contribuir para alguns passos no processo múltiplo de transformação oncogénica celular encontrando-se particularmente associado ao cancro do cólon (Mughini-gras et al, 2018).

O alimento mais frequentemente associado a infeções provocadas por *Salmonella* é a carne vermelha e de aves (Catford et al, 2017). Os “nuggets” de frango têm sido implicados na transmissão desta bactéria, uma vez que são habitualmente comercializados congelados e o processo de fritura necessário ao seu consumo poderá não inativar a bactéria, devido ao facto, de algumas partes do alimento poderem permanecer cruas após o procedimento (Catford et al, 2017).

3.5. *Listeria* spp.

O género *Listeria* é constituído por oito espécies, entre as quais se encontra, *L. monocytogenes*, a mais relevante quando falamos de segurança alimentar, uma vez que possui uma elevada taxa de mortalidade que se localiza entre 20 a 40% (Abdellrazeq et al, 2014). A bactéria é de Gram positivo, anaeróbica facultativa, móvel, não formadora de esporos, halotolerante e apresenta-se sob a forma de coco (Alsheikh et al, 2014). Consegue crescer numa grande variedade de valores de pH (4,6 a 9,5), em ambientes de baixa atividade de água, como 0,90, e é psicotrófica (Alsheikh et al, 2014). Esta capacidade permite-lhe multiplicar-se a temperaturas de refrigeração, tendo sido reportado crescimento até 1 °C (Taylor et al, 2008). Assim sendo, apesar da dose de infeção ser elevada, a bactéria possui facilidade em se multiplicar em condições não ideais o que a torna uma potencial ameaça à saúde humana (Taylor et al, 2008).

Vegetais crus, pescado e aves são itens alimentares com elevado risco de contaminação por *L. monocytogenes* (Abdellrazeq et al, 2014). A infeção alimentar despoletada pela presença da bactéria pode resultar numa grande variedade de sintomas, sendo os mais comuns: febre, diarreia, dor de cabeça, náuseas, vômitos e dor abdominal (McNeil et al, 2017). Grávidas, recém-nascidos, idosos ou indivíduos com o sistema imunocomprometido são particularmente suscetíveis a esta bactéria (Abdellrazeq et al, 2014). Nos referidos pacientes, esta infeção pode manifestar-se como aborto, nascimentos antecipados, septicemia, entre outros (Abdellrazeq et al, 2014).

Ao longo dos anos muitos surtos microbiológicos alimentares a nível global têm sido reportados devido à presença de *L. monocytogenes*, tendo a UE registado um aumento dos mesmos (Food, E., & Authority, S., 2018). A título de exemplo, em 2017 um surto confirmou 47 casos e 9 mortes verificadas em cinco países Europeus: Finlândia (23 casos), Reino Unido (11 casos), Suécia (7 casos), Dinamarca (4 casos) e Áustria (2 casos) (Food, E., & Authority,

S., 2018). Na origem deste acontecimento encontrava-se uma planta que contaminou os restantes vegetais comercializados congelados com os quais teve contacto (Food, E., & Authority, S., 2018).

3.6. *Campylobacter jejuni*

Campylobacter spp. apresenta células pequenas com forma espiral e de Gram negativo (Humphrey et al, 2007). A diferença mais significativa deste patógeno alimentar em relação aos restantes é a sua necessidade de condições de microaerofilia, ou seja, atmosferas que contém aproximadamente 10% de CO₂ e aproximadamente 5% de O₂ constituem o ambiente ideal para que possa multiplicar-se (Altekruse et al, 1999).

Campylobacter jejuni é extensivamente encontrado na natureza, possuiu a capacidade de colonização do trato intestinal tanto de mamíferos como de aves, e a sua transmissão a humanos ocorre via produtos alimentares (Silva et al, 2011). A maioria dos casos de campilobacteriose são associados com o consumo de carne de aves mal cozinhada, leite não pasteurizado e água contaminada (Altekruse et al, 1999). O número de surtos alimentares documentados associados com fruta e vegetais tem vindo a aumentar (Silva et al, 2011). Estes alimentos podem apresentar-se como um risco para a saúde pública e resultam, por norma, de irrigação com água contaminada (Bintsis, 2017). O referido microrganismo consegue invadir a camada epitelial do intestino humano e penetrar nas células que a compõem (Silva et al, 2011). Os sintomas mais comuns de infeção por *Campylobacter* são dor abdominal, febre, náuseas e vômitos (Humphrey et al, 2007). *C. jejuni* é uma das causas mais comuns de diarreia, sendo responsável por aproximadamente 85000 doenças, 8500 hospitalizações e 76 mortes por ano nos EUA (Bintsis, 2017). Em 2015, a bactéria manteve-se como o patógeno gastrointestinal bacteriano mais comum em humanos na UE (Bintsis, 2017). A organização mundial de saúde estima que 1% da população pertencente à Europa Ocidental será afetada com *Campylobacter* todos os anos (Bintsis, 2017).

3.7. *Clostridium* spp.

O género *Clostridium* pertence à família *Bacillaceae* e, inclui anaeróbios obrigatórios e aerotolerantes, cocos formadores de esporos na presença de O₂ e, são de Gram positivo (Bintsis, 2017). Na maioria das espécies, as células vegetativas surgem como curvadas ou alongadas, variando de cocos curtos a formas longas filamentosas com fins arredondados, que ocorrem em pares ou em cadeias com tamanhos variados (Bintsis, 2017). Este microrganismo é ubíquo, sendo mais prevalente no solo e no trato intestinal de animais (Bintsis, 2017). As formas características de *Clostridium* são atribuídas à presença de endósporos que se desenvolvem sob condições não favoráveis para crescimento vegetativo (Bintsis, 2017).

C. botulinum é um dos microrganismos mais relevantes no âmbito de intoxicações alimentares, este pode encontrar-se presente no solo, água, sedimentos marinhos e trato intestinal de animais, e, conseqüentemente, pode surgir numa grande variedade de alimentos sejam estes de origem animal ou vegetal (Sobel, 2005). Existem sete estirpes pertencentes a esta espécie que são produtoras de neurotoxinas distintas, sendo cada um dos tipos designados por letras de A a G (Sobel, 2005). O processo térmico é o método mais

frequentemente utilizado para inativar esporos de *C. botulinum* em alimentos (Peck, 2005). Os sintomas da ingestão de neurotoxina do botulismo surgem cerca de 12 a 36 horas após o seu consumo e inicialmente podem incluir náuseas e vômitos (Sobel, 2005). No entanto, estes são seguidos por outros como dificuldade na visão e paralisia aguda que se inicia nos músculos da face, cabeça, faringe e, de seguida, se alastra para o tórax e extremidades podendo conduzir à morte devido a falência respiratória (Sobel, 2005). O botulismo pode ocorrer devido a dois fenómenos, a ingestão da neurotoxina com o consumo de alimentos, ou através da produção da mesma por *C. botulinum* após ocorrer colonização intestinal, sendo que este último caso é mais frequente em crianças e idosos, uma vez que o mesmo resulta da falta de competição microbiana, ou seja, de uma microbiota intestinal deficiente (Sobel, 2005).

C. perfringens é uma bactéria formadora de esporos e um habitante natural do solo e do trato intestinal de animais, nomeadamente, de humanos (Brynstad et al, 2002). A sua natureza ubíqua e os seus esporos tornam o patogénico um problema frequente na indústria alimentar (Brynstad et al, 2002). Apresenta células encapsuladas com forma arredondada produtoras de toxinas e possuiu a capacidade de formar esporos resistentes a condições ambientais de stress para a célula, como radiação, dissecação e calor (Labbé e Juneja, 2017). *C. perfringens* possui um dos tempos de geração mais curtos do universo bacteriano, tendo já sido observado períodos de 7 a 8 minutos em carne vermelha (Labbé e Juneja, 2017). A utilização de temperaturas elevadas na conservação de alimentos permite que se reúnam as condições para que a bactéria possa produzir esporos que possuem a particularidade de sobreviver a processos de cozedura (Labbé e Juneja, 2017). A temperatura limite de crescimento situa-se, por norma, entre os 15 e 50 °C, havendo observações de multiplicação a valores inferiores (Brynstad et al, 2002).

C. perfringens são também produtores de toxinas, sendo capazes de gerar 13 diferentes, no entanto, cada estirpe só consegue gerar um tipo, sendo que as designadas por letras de A a E são as mais letais (Brynstad et al, 2002). As enterotoxinas vão ligar-se a células epiteliais do intestino, causando danos citotóxicos na membrana celular e, conseqüentemente, causam alteração da permeabilidade destas originando diarreia e dores abdominais (Labbé e Juneja, 2017). Por norma, os sintomas surgem 8 a 24 horas após a ingestão e incluem tipicamente dor abdominal, existindo a possibilidade de surgirem náuseas e vômitos, que persistirão num período de 24 a 48 horas (Labbé e Juneja, 2017).

4. Efeitos do processo de congelação no comportamento bacteriano

A maioria dos processos biológicos é dependente dos valores de temperatura ambiente, salvo raras exceções (El-Kest et al, 1992). As condições ideais de crescimento da maioria das bactérias encontram-se entre os 20 e os 45 °C, no entanto, o valor ótimo é característico de cada estirpe (Bintsis, 2017). A presença de valores negativos de temperatura implica dificuldade no desenvolvimento dos microrganismos o que resulta, por norma, numa diminuição da concentração celular ao longo do tempo (Junttila et al, 1988). A sobrevivência nestas condições resulta de mecanismos de adaptação, criados a partir da necessidade de ultrapassar condições adversas como a redução da fluidez membranar, que conseqüentemente, diminui a capacidade de incorporação de nutrientes

pelas células; aumento do enrolamento de DNA, que dificulta a sua replicação e a transcrição; redução da atividade enzimática, o que torna todos os processos associados a arranjo proteico lentos ou ineficientes e diminuição da taxa metabólica que irá alterar a composição membranar (Junttila et al, 1988). Outro fator bastante relevante em processos de congelação é a disponibilidade de água, uma vez que ao ser submetida a valores de temperatura negativos o seu estado físico será alterado para uma fase sólida (Junttila et al, 1988). Este fenómeno pode originar a formação de cristais de gelo intracelulares podendo, assim, provocar danos membranares ou constituir um fator letal para as células microbianas (El-Kest et al, 1992). O tamanho destas formações é proporcional à taxa de arrefecimento, ou seja, quanto mais rápido o processo decorrer, menor será o tamanho do cristal que eventualmente se formará (Golden et al, 1997). Tipicamente, uma congelação rápida favorece a sobrevivência de microrganismos, uma vez que uma aceleração do processo gera cristais de gelo intracelulares menores reduzindo, assim, o risco de danos celulares (Speck et al, 1977). No entanto, caso os cristais de gelo atinjam dimensões consideráveis vão danificar a membrana plasmática o que resultará na saída de constituintes da célula e, conseqüentemente, ocorre a perda da manutenção do ambiente celular interno desejado (Golden et al, 1997). No seguimento, o meio extracelular torna-se hipertónico o que favorece a saída de água por osmose, provocando a desidratação do organismo (El-Kest et al, 1992). A possibilidade de formação de cristais de gelo extracelulares é também um fator importante a considerar em termos de sobrevivência bacteriana em processo de congelação (El-Kest et al, 1992). Este efeito físico diminui a quantidade de água disponível no espaço exterior à célula o que contribui para a desidratação da mesma (El-Kest et al, 1992).

O efeito letal do processo de congelação pode ser potenciado se o organismo for sujeito a outros tratamentos posteriormente como irradiação, refrigeração ou acidificação (Speck et al, 1977).

A taxa de mortalidade microbiana varia ao longo do processo de congelação, sendo caracteristicamente mais elevada na fase inicial, diminuindo de seguida (Speck et al, 1977). Valores negativos de temperatura mais baixos providenciam uma maior resistência microbiana do que valores mais elevados (Speck et al, 1977). Atualmente na grande maioria dos países a temperatura de armazenamento utilizada para efeitos de congelação, é -18 °C, uma vez que, assegura que os referidos organismos não se irão multiplicar sob estas condições (Geiges, 1996). Em muitas especificações legais é permitido oscilações de valores de temperatura até -15 °C durante curtos períodos de armazenamento de produtos alimentares, uma vez que manter uma temperatura negativa constante é uma prática que apresenta algumas dificuldades e limitações (Geiges, 1996). Alguns microrganismos são altamente resistentes à congelação prolongada e já foram observadas taxas de sobrevivência durante 10 anos de armazenamento (Golden et al, 1997).

As bactérias de Gram positivo são geralmente mais resistentes a congelação do que bactérias de Gram negativo, sendo, por sua vez, os cocos mais tolerantes do que os bastonetes (Speck et al, 1977). As leveduras e bolores possuem tipicamente uma maior capacidade de sobrevivência a temperaturas negativas do que os restantes microrganismos sobretudo devido à sua elevada tolerância a valores de atividade de água muito reduzidos (Golden et al, 1997). Os esporos microbianos são extremamente resistentes a

temperaturas abaixo de zero (Archer, 2004). As toxinas produzidas pelas diferentes bactérias possuem também uma elevada resistência à congelação, nomeadamente, toxinas de *C. botulinum* e *S. aureus*, o que torna possível que ocorram intoxicações alimentares provocadas pelo consumo de produtos congelados (Archer, 2004). Células que se encontrem em fase de crescimento exponencial são mais sensíveis a danos causados por congelação do que as que se encontrem em fase estacionária e em fase lag que, por norma, não são suscetíveis à rápida diminuição da temperatura (Speck et al, 1977). As diferenças na sensibilidade ao processo de congelação são atribuídas a variações na atividade fisiológica das espécies (Archer, 2004).

5. Efeitos do processo de congelação/descongelação no comportamento bacteriano

A sobrevivência de microrganismos patogénicos durante o processo de congelação/descongelação é dependente de diversos fatores, como o modo como é efetuado o procedimento, a estirpe em questão, a concentração celular, a taxa de velocidade com que ocorre o processo de descongelação, o género alimentar e a sua composição (Kataoka et al, 2017). Ciclos repetitivos de congelação/descongelação são altamente letais (Speck et al, 1977). Os danos provocados pelos fenómenos de congelação e descongelação podem não ser letais, no entanto, poderão ter um efeito na capacidade de proliferação do microrganismo, podendo este encontrar-se impossibilitado, numa fase inicial, de crescer em meio seletivo impedindo, assim, a sua quantificação ou deteção (Archer, 2004). Em determinadas situações a identificação de microrganismos nas condições descritas é realizado após um processo de enriquecimento (Speck et al, 1977).

O stress causado pelos fenómenos de congelação/descongelação em células bacterianas pode manifestar-se de diversas formas, a título de exemplo, pode verificar-se um aumento no período lag, diminuição na taxa de geração e estimulação de determinados processos enzimáticos resultantes de um aumento de penetração de algumas substâncias nas células devido a interrupção da permeabilidade da membrana plasmática (El-Kest et al, 1992). Ao iniciar o processo de descongelação de alimentos, os cristais de gelo, que se podem ter formado durante o processo de congelação, vão aumentar o que provoca stress físico nas células microbianas (Kataoka et al, 2017). Neste processo é necessário ter em conta que a superfície de géneros alimentares congelados irá atingir temperaturas mais elevadas primeiro do que as porções internas do produto o que pode resultar em maior crescimento microbiano à superfície dos produtos parcialmente descongelados (Golden et al, 1997).

É necessário ter em consideração que a sobrevivência e o crescimento bacteriano em alimentos não se encontram só dependentes dos fatores ambientais a que os mesmos são expostos, mas também da composição química e estrutural dos produtos (Wilson et al, 2002). A resistência microbiana a fenómenos de congelação é aumentada pela viscosidade de um alimento e pela sua composição crescente em proteínas, hidratos de carbono simples e complexos e por triglicéridos (Speck et al, 1977). A redução da resistência encontra-se associada com a presença de certos iões, sais inorgânicos, componentes ativos da superfície, e certas enzimas (Speck et al, 1977).

6. Microbiologia preditiva

A microbiologia preditiva é um aspeto chave quando nos referimos a segurança alimentar, uma vez que esta integra microbiologia, modelos matemáticos, estatística e sistemas de informação para estimar o comportamento bacteriano sob certas condições ambientais e características de cada produto (Valdramidis, 2016). É necessário considerar que uma pequena alteração num determinado componente, como por exemplo, o pH, pode provocar uma alteração comportamental nos microrganismos presentes no produto alimentar (Valdramidis, 2016). Quando não são consideradas todas as alterações que possam ocorrer, podemos estar a utilizar um modelo preditivo que produza subestimações ou sobrestimações (Valdramidis, 2016).

Já foram desenvolvidos diversos modelos matemáticos com o propósito de prever o crescimento de patogénicos bacterianos em matrizes alimentares complexas (Valdramidis, 2016). Inicialmente este tipo de informação era gerado a partir de comportamento microbiano em meios laboratoriais (Nyhan et al, 2018). Em consequência, estes apresentavam erros significativos quando aplicados a alimentos, particularmente, sob condições dinâmicas, como alteração de temperatura, que ocorre frequentemente ao longo de uma cadeia de produção e transporte até à sua comercialização (Nyhan et al, 2018). Nyhan et al (2018) comprovaram que o crescimento de *L. monocytogenes* em puré de courgette e molho de “béarnaise” quando comparado com o desenvolvimento da mesma bactéria em meio Brain Heart Infusion (BHI), apresentava um maior número de células num espaço de tempo mais curto (Nyhan et al, 2018). Concluindo assim, que o modelo pré-definido a partir de meios laboratoriais, apresentava uma subestimação do crescimento bacteriano em matrizes alimentares (Nyhan et al, 2018).

A segurança microbiana e a estabilidade da maioria dos alimentos são baseadas na aplicação de fatores conservantes combinados ou na adaptação das condições ambientais a que os produtos se encontram submetidos (Johnson et al, 2014). Recentemente, a conjugação destes componentes físico-químicos tem-se tornado mais prevalente devido a um conhecimento mais extenso sobre a mesma (Johnson et al, 2014). A título de exemplo, ao longo dos últimos anos surgiu uma crescente necessidade da utilização de conservantes alimentares naturais, como resultado de uma mudança no estilo de vida dos consumidores no sentido de promoção da saúde (Haute et al, 2016). Os óleos essenciais, devido à sua capacidade antimicrobiana, presente em especiarias como *Origanum vulgare* (orégãos), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Cinnamomum zeylanicum* (canela) têm sido cada vez mais utilizados como conservantes alimentares (Haute et al, 2016). Haute et al (2016) comprovaram que a utilização destes componentes diminui a proliferação microbiana em alimentos como carne, marisco e pescado.

A estrutura do género alimentar é relevante na resposta comportamental das diferentes espécies bacterianas (Baka et al, 2016 a). Baka et al (2016, a) estudaram a influência da estrutura de produtos de pescado processado na proliferação de *Salmonella typhimurium* e *S. aureus* (Baka et al, 2016 a). Os modelos desenvolvidos foram submetidos a diversos valores de temperatura que simulam o armazenamento do produto em refrigeração (4 °C), e valores representativos de possíveis abusos que ocorrem durante o transporte (8 e 12 °C) (Baka et al, 2016 a). Verificou-se algumas diferenças entre modelos preditivos

fornecidos pelo ComBase e os desenvolvidos no estudo (Baka et al, 2016 a). As duas espécies bacterianas testadas apresentaram comportamentos diferentes que variaram consoante as condições ambientais, assim como com as diferentes características dos produtos alimentares considerados (Baka et al, 2016 a).

Baka et al (2016 b) observaram o comportamento de *L. monocytogenes* em diversas estruturas alimentares a valores de temperatura diferentes (4, 8 e 12 °C). Verificou-se que o crescimento era mais rápido em superfícies do que em sistemas líquidos e géis aquosos e, por fim, em emulsões e emulsões gelificadas, a todos os valores de temperatura avaliados (Baka et al, 2016 b). Os autores observaram também que o stress provocado pela temperatura favorece o crescimento microbiano planctónico, embora a níveis mais próximos do valor de temperatura ótimo de desenvolvimento microbiano, o crescimento em superfícies sólidas é mais favorável, tendo sido também já reportado em outros estudos (Baka et al, 2016 b). Tal indica que a temperatura é um fator bastante importante no crescimento microbiano (Baka et al, 2016 b). Verificou-se um crescimento superior em colónias superficiais em comparação com colónias imersas, o que indica que alimentos que possuam maior rigidez impedem a penetração das células e, portanto, um maior crescimento (Baka et al, 2016 b).

Em suma, o crescimento bacteriano em alimentos é dependente de uma grande variedade de condições e ocorrem variações dependentes da estirpe utilizada, do produto em questão e das condições ambientais a que o alimento se encontra sujeito (Kataoka et al, 2017). Deste modo, os presentes estudos propõem-se a definir uma temperatura e um período a que o transporte de géneros alimentares congelados possa ser efetuado sem que os valores microbiológicos dos mesmos se alterem significativamente. O procedimento focou-se em compreender qual o comportamento de *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* e *S. typhimurium* ao longo do processo de congelação e descongelação quando presentes numa larga variedade de produtos alimentares.

Material e Métodos

1.1. Preparação do stock bacteriano: As estirpes microbianas utilizadas, MR9 *S. typhimurium* (WDCM 00031), MR23 *L. monocytogenes* (WDCM 00021), MR27 *S. aureus* (WDCM 00034) e MR34 *E. coli* (WDCM 00090) foram obtidas a partir de culturas bacterianas armazenadas a (-80 °C), provenientes da empresa na qual o presente estudo foi realizado. Para possibilitar a utilização das mesmas foram elaborados stocks conservados a (-18 °C). Semanalmente foram preparadas soluções bacterianas em meio BHI, sendo estas incubadas a 37 °C durante 18 a 24 horas, de modo, a proporcionar condições que permitissem crescimento suficientemente elevado para se proceder à contaminação das amostras de alimentos.

1.2. Contagem unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL): Após o período de incubação das culturas bacterianas utilizadas para contaminação das amostras de alimentos, foi efetuada a contagem de unidades formadoras de colónias por mililitro de cada uma destas. A solução foi diluída 1:10 até à diluição 10^6 sendo posteriormente efetuado o método da gota em meio Tryptic Soy Agar (TSA), tendo este sido previamente comprovado como eficiente pela empresa. 1 microlitro de cada diluição foi semeado em meio TSA que posteriormente foi incubado a 37 °C durante 18 a 24 horas. Ao fim do período referido foi efetuada a contagem na diluição que apresentava valores entre 30 a 300 UFC por placa.

1.3. Contaminação de alimento: As amostras alimentares utilizadas no presente estudo foram obtidas a partir de remanescentes de amostras recebidas pela empresa ALS Controlvet provenientes de clientes da mesma no período de duração do estágio (Outubro de 2019 a Fevereiro de 2020). O trabalho dividiu-se em dois procedimentos independentes. O primeiro ensaio resultou da contaminação de amostras alimentares com isolados bacterianos que foram submetidas a descongelação a temperatura ambiente (18 a 25 °C) durante um período de 9 horas. Foi pesado $125 \pm 0,5$ g de cada produto (sendo o ensaio repetido 3 vezes), e de seguida, adicionado 100 mL de água estéril e 1 mL de solução de cada estirpe bacteriana (MR9 *S. typhimurium*, MR23 *L. monocytogenes*, MR27 *S. aureus* e MR34 *E. coli*) a uma concentração na ordem de 10^5 UFC/mL. A incubação nesta solução foi de 2 horas. Após este período, as amostras foram transferidas para um saco estéril e, foram posteriormente, congelados a -18 °C. O segundo ensaio difere na temperatura de descongelação utilizada, 1,5 e 4 °C, e no período considerado, possuindo uma duração de 96 horas. O procedimento de contaminação foi semelhante, no entanto, a quantidade de alimento pesado foi de $50 \pm 0,5$ g e somente uma das estirpes referidas foi inoculada em cada amostra, tendo sido o processo repetido individualmente para cada uma das espécies. Cada alimento utilizado e respetivas estirpes microbianas utilizadas na sua contaminação são apresentadas na Tabela 1, assim como o seu tempo de congelação.

Tabela 1. Lista das amostras alimentares contaminadas com espécies bacterianas e, respetivo tempo de congelação, valor de temperatura e tempo de descongelação.

Código	Alimento	Estirpe microbiana	Tempo de congelação	Temperatura de descongelação	Tempo de descongelação
4A	Peru	<i>B. cereus</i> <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>S. typhimurium</i>	7 dias	Ambiente (18 -25 °C)	9 horas
4B	Frango	<i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i>	12 dias	Ambiente (18 -25 °C)	9 horas
4C	*Mistura de Vegetais	<i>B. cereus</i> <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>S. typhimurium</i>	7 dias	Ambiente (18 -25 °C)	9 horas
4D	Salmão	<i>B. cereus</i> <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>S. typhimurium</i>	5 dias	Ambiente (18 -25 °C)	9 horas
4E	Couve-de-bruxelas	<i>B. cereus</i> <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>S. typhimurium</i>	7 dias	Ambiente (18 -25 °C)	9 horas
4F	Cogumelos	<i>B. cereus</i> <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>S. typhimurium</i>	6 dias	Ambiente (18 -25 °C)	9 horas
4G	Frango	<i>B. cereus</i> <i>E. coli</i>	6 dias	Ambiente (18 -25 °C)	9 horas

		<i>S. typhimurium</i>			
4H	**Marisco	<i>B. cereus</i> <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>S. typhimurium</i>	19 dias	Ambiente (18 -25 °C)	9 horas
4I	Lulas	<i>B. cereus</i> <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>S. typhimurium</i>	20 dias	Ambiente (18 -25 °C)	9 horas
4K	Carne vermelha	<i>B. cereus</i> <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>S. typhimurium</i>	3 dias	Ambiente (18 -25 °C)	9 horas
6A	Peru	<i>S. aureus</i>	5 dias	4 °C	96 horas
6B	Frango	<i>S. aureus</i>	5 dias	4 °C	96 horas
6C	*Mistura de Vegetais	<i>S. aureus</i>	11 dias	4 °C	96 horas
6E	Cogumelos	<i>S. aureus</i>	4 dias	4 °C	96 horas
6I	Camarão	<i>S. aureus</i>	6 dias	4 °C	96 horas
6L	Batatas	<i>S. aureus</i>	4 dias	4 °C	96 horas
7A	Peru	<i>E. coli</i>	5 dias	4 °C	96 horas
7C	Vegetais	<i>E. coli</i>	11 dias	4 °C	96 horas
7E	Cogumelos	<i>E. coli</i>	25 dias	4 °C	96 horas
7G	Lulas	<i>E. coli</i>	8 dias	4 °C	96 horas
7I	Camarão	<i>E. coli</i>	5 dias	4 °C	96 horas
7L	Batatas	<i>E. coli</i>	4 dias	4 °C	96 horas

8A	Peru	<i>L. monocytogenes</i>	5 dias	4 °C	96 horas
8C	*Mistura de Vegetais	<i>L. monocytogenes</i>	11 dias	4 °C	96 horas
8E	Cogumelos	<i>L. monocytogenes</i>	5 dias	4 °C	96 horas
8G	Lulas	<i>L. monocytogenes</i>	5 dias	4 °C	96 horas
8H	Carne vermelha	<i>L. monocytogenes</i>	5 dias	4 °C	96 horas
8I	Camarão	<i>L. monocytogenes</i>	5 dias	4 °C	96 horas
8L	Batatas	<i>L. monocytogenes</i>	4 dias	4 °C	96 horas
9A	Peru	<i>S. aureus</i>	3 dias	1,5 °C	96 horas
9B	Frango	<i>S. aureus</i>	4 dias	1,5 °C	96 horas
9C	*Mistura de Vegetais	<i>S. aureus</i>	4 dias	1,5 °C	96 horas
9E	Cogumelos	<i>S. aureus</i>	3 dias	1,5 °C	96 horas
9G	Lulas	<i>S. aureus</i>	4 dias	1,5 °C	96 horas
9I	Camarão	<i>S. aureus</i>	5 dias	1,5 °C	96 horas
9L	Batatas	<i>S. aureus</i>	4 dias	1,5 °C	96 horas
10A	Peru	<i>E. coli</i>	3 dias	1,5 °C	96 horas
10B	Frango	<i>E. coli</i>	3 dias	1,5 °C	96 horas
10C	*Mistura de vegetais	<i>E. coli</i>	4 dias	1,5 °C	96 horas
10E	Cogumelos	<i>E. coli</i>	3 dias	1,5 °C	96 horas
10G	Lulas	<i>E. coli</i>	4 dias	1,5 °C	96 horas
10H	Carne vermelha	<i>E. coli</i>	3 dias	1,5 °C	96 horas
10I	Camarão	<i>E. coli</i>	5 dias	1,5 °C	96 horas
10L	Batatas	<i>E. coli</i>	4 dias	1,5 °C	96 horas
11A	Peru	<i>L. monocytogenes</i>	3 dias	1,5 °C	96 horas

11B	Frango	<i>L. monocytogenes</i>	4 dias	1,5 °C	96 horas
11C	*Mistura de vegetais	<i>L. monocytogenes</i>	4 dias	1,5 °C	96 horas
11E	Cogumelos	<i>L. monocytogenes</i>	3 dias	1,5 °C	96 horas
11G	Lulas	<i>L. monocytogenes</i>	4 dias	1,5 °C	96 horas
11H	Carne vermelha	<i>L. monocytogenes</i>	3 dias	1,5 °C	96 horas
11I	Camarão	<i>L. monocytogenes</i>	5 dias	1,5 °C	96 horas
11J	***Pescado	<i>L. monocytogenes</i>	6 dias	1,5 °C	96 horas
11K	***Pescado	<i>L. monocytogenes</i>	6 dias	1,5 °C	96 horas
11L	Batatas	<i>L. monocytogenes</i>	4 dias	1,5 °C	96 horas

*Mistura de vegetais era composto por pimento vermelho, pimento verde, milho, cenoura, feijão-verde e ervilha.

**Marisco era composto por mexilhão, camarão, ameijoas, delícias do mar.

***Não discriminado

1.4. Análise das amostras alimentares:

- A. Análise de amostras alimentares que foram submetidas a descongelação a temperatura ambiente num período de 9 horas. O produto foi descongelado a temperatura ambiente do laboratório (18-25 °C), a análise foi iniciada após decorrida a primeira hora de descongelação e a partir deste momento foi realizada com a periodicidade de duas horas, durante as seguintes 8 horas. Para cada análise foi retirada uma quantidade de $25 \pm 0,5$ g. A amostra foi diluída em 1:10 em água peptonada tamponada (APT), homogeneizada no stomacher durante 60 segundos. De seguida a amostra foi diluída de 1:10 em triptona sal sendo, posteriormente, quantificado ou observada a presença dos microrganismos nos respetivos meios usando temperaturas e tempos de incubação apropriados para cada microrganismo (consultar Tabela 2).
- B. Análise de amostras alimentares que foram submetidas a descongelação a temperatura de refrigeração num período 96 horas. O produto foi submetido ao processo de descongelação a 1,5 ou $4 \pm 0,1$ °C, sendo efetuada uma análise diária com um intervalo de 24 horas durante cinco dias sucessivos, tendo sido realizada a primeira no dia de descongelação. Para cada análise foi retirada uma quantidade de $10 \pm 0,5$ g do produto, sendo efetuado o mesmo em 3 réplicas. A amostra foi diluída em APT e, de seguida, homogeneizada no stomacher durante 60 segundos. Foram realizadas diluições sucessivas de 1:10 em triptona sal e quantificado ou observado presença dos

microrganismos nos respetivos meios usando temperaturas e tempos de incubação apropriados para cada microrganismo (consultar Tabela 2)

Na deteção de *Salmonella* foi realizado um procedimento de enriquecimento, após a diluição com APT, sendo que nesta situação foi adicionado aditivo de *Salmonella*, tendo sido incubado a 37 °C durante 18 a 24 horas. Após este período foi efetuada uma repicagem da solução para meio “Rapid” que foi novamente incubado a 37 °C durante 24 horas.

Tabela 2. Lista do meio de cultura para quantificação dos microrganismos inoculados nos alimentos e respetiva temperatura e período de incubação.

Microrganismo	Meio de cultura	Temperatura de incubação	Período de incubação
<i>S. typhimurium</i> (MR9)	Rapid (procedimento de enriquecimento prévio)	37 °C	24H
<i>L. monocytogenes</i> (MR23)	Compass	37 °C	48H
<i>S. aureus</i> (MR27)	Baird Parker (BP)	37 °C	24H
<i>E. coli</i> (MR34)	TBX	44 °C	18-24H

1.5. Contagens: Após o período de incubação as unidades formadoras de colónias dos seguintes microrganismos, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli* foram contabilizadas. No caso de *Salmonella* foi apenas detetada a sua presença ou ausência. A presença desta bactéria é detetada através do crescimento de colónias com coloração roxa que foram, de seguida, submetidas a testes bioquímicos de confirmação: oxidase, OMNIASE e ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -galactoside), cujos resultados deverão ser negativos, positivos e negativos, respetivamente.

A figura 1 resume o processo de material e métodos aqui descrito.

Resultados e Discussão

As amostras alimentares (peru; frango; mistura de vegetais; salmão; couve-de-bruxelas; cogumelos; marisco; lulas; carne vermelha) foram contaminadas com *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. typhimurium*, simultaneamente, e foram posteriormente congeladas, durante um período máximo de 20 dias, a (-18) °C. De modo, a avaliar o comportamento das referidas espécies bacterianas ao longo do processo de descongelação dos alimentados estes foram submetidos a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 9 horas, tendo a sua análise sido realizada com uma periodicidade de 2 horas, iniciando-se 1 hora após a submissão às referidas condições.

1.1. Peru

E. coli e *S. aureus* apresentaram um comportamento semelhante quando inoculadas em peru. O teor de *E. coli* diminuiu até às 7 horas (0,2 log UFC/g), seguindo-se um aumento de 0,3 log UFC/g. Por sua vez, *S. aureus* apresentou uma descida ao longo do período considerado (0,3 log UFC/g). Verificou-se que *L. monocytogenes* aumentou cerca de 0,8 log UCF/g nas últimas duas horas.

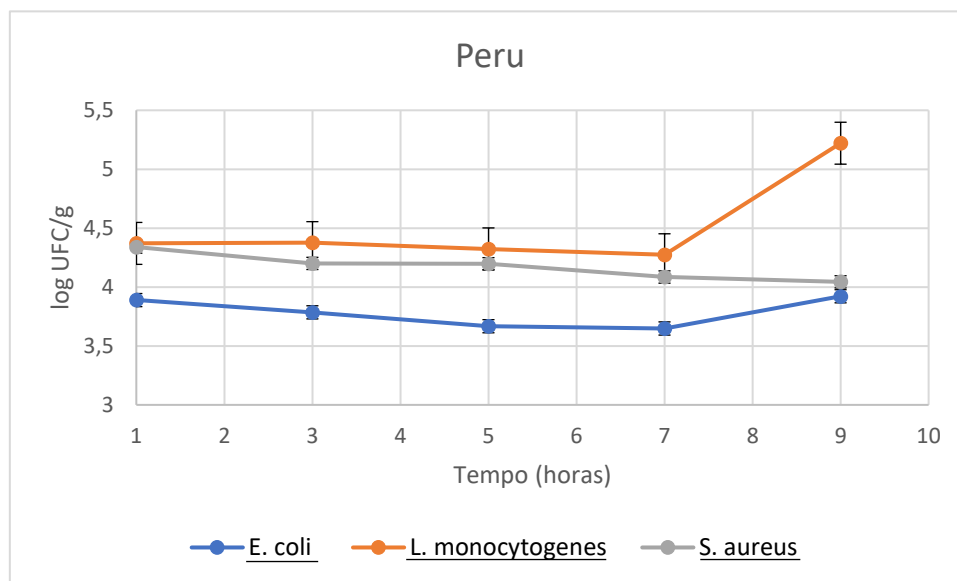


Gráfico 1. Crescimento de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* em peru ao longo de 9 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 1, tabela 1 do anexo 2 e tabela 1 do anexo 3 para valores referentes a *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respetivamente), a temperatura ambiente (18 – 25 °C). δ (*E. coli*) = 0,11137; δ (*L. monocytogenes*) = 0,355786; δ (*S. aureus*) = 0,103475; p= 0,002134

1.2. Frango

A densidade populacional de *E. coli* e *S. aureus* em frango manteve-se constante durante 9 horas de descongelação à temperatura ambiente (18-25 °C). A variação observada foi apenas de 0,1 a 0,2 log UFC/g. No entanto, a densidade de *L. monocytogenes* apresentou um aumento de, cerca de 0,8 log UFC/g no fim do período de incubação.

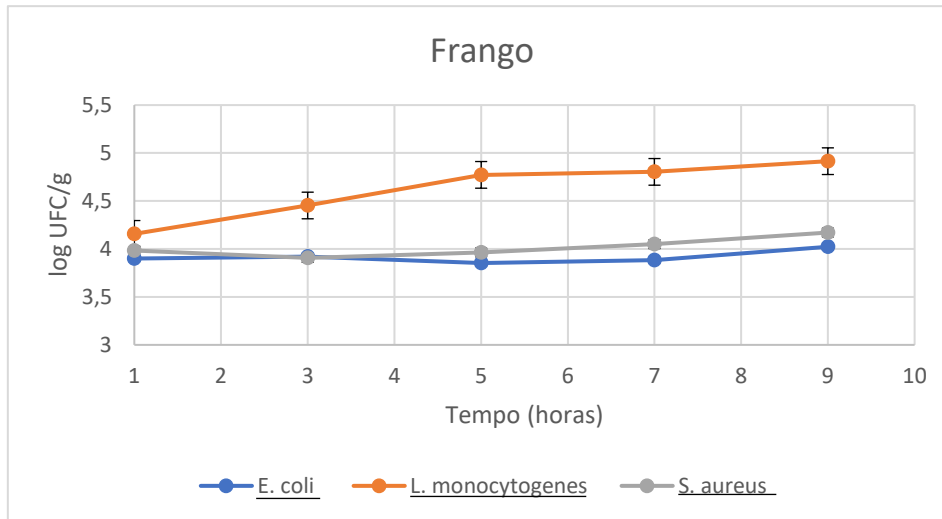


Gráfico 2. Crescimento de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* em frango ao longo de 9 horas (consultar tabela 1, pertencente ao anexo 1, tabela 1 do anexo 2 e tabela 1 do anexo 3 para valores referentes a *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respetivamente), a temperatura ambiente (18 – 25 °C). δ (*E. coli*) = 0,057659; δ (*L. monocytogenes*) = 0,27784; δ (*S. aureus*) = 0,090506; $p = 0,000162$

1.3. Carne vermelha

S. aureus não foi avaliado em carne vermelha. *E. coli* apresentou valores estáveis ao longo do período de análise (variações inferiores a 0,2 log UFC/g). Por outro lado *L. monocytogenes* aumentou 0,6 log UFC/g após 9 horas.

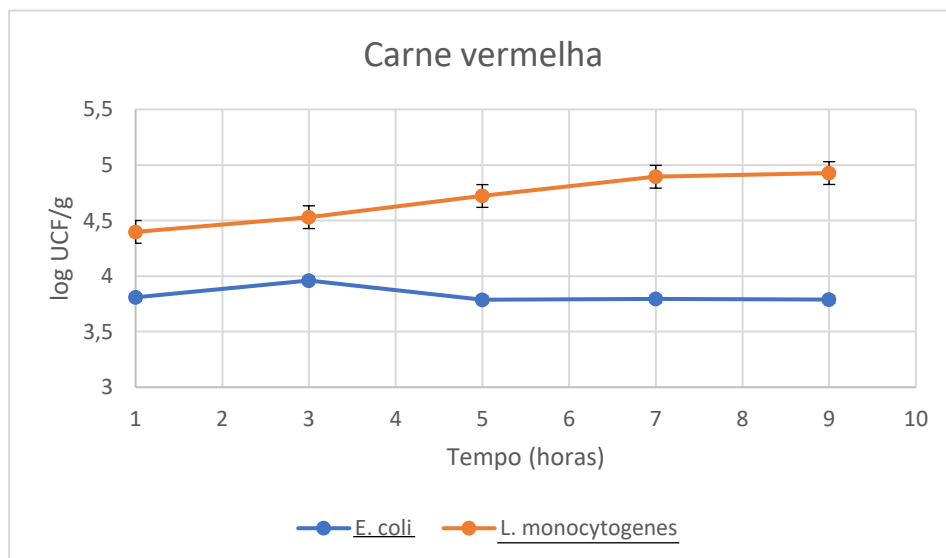


Gráfico 3. Crescimento de *E. coli* e *L. monocytogenes* em carne vermelha ao longo de 9 horas (consultar tabela 1, pertencente ao anexo 1 e tabela 1 do anexo 2, para valores referentes a *E. coli* e *L. monocytogenes*, respetivamente), a temperatura ambiente (18 – 25 °C). δ (*E. coli*) = 0,066424; δ (*L. monocytogenes*) = 0,204798; $p = 4,19E-05$

1.4. Mistura de Vegetais

Uma mistura de vegetais (pimento vermelho, feijão-verde, milho e cenoura) ao ser inoculada com *L. monocytogenes* e *E. coli*, observou-se aumento de 0,5 log UFC/g ao longo de 9 horas à temperatura ambiente (18-25 °C). *S. aureus* aumentou a sua densidade celular apenas 0,2 log UFC/g.

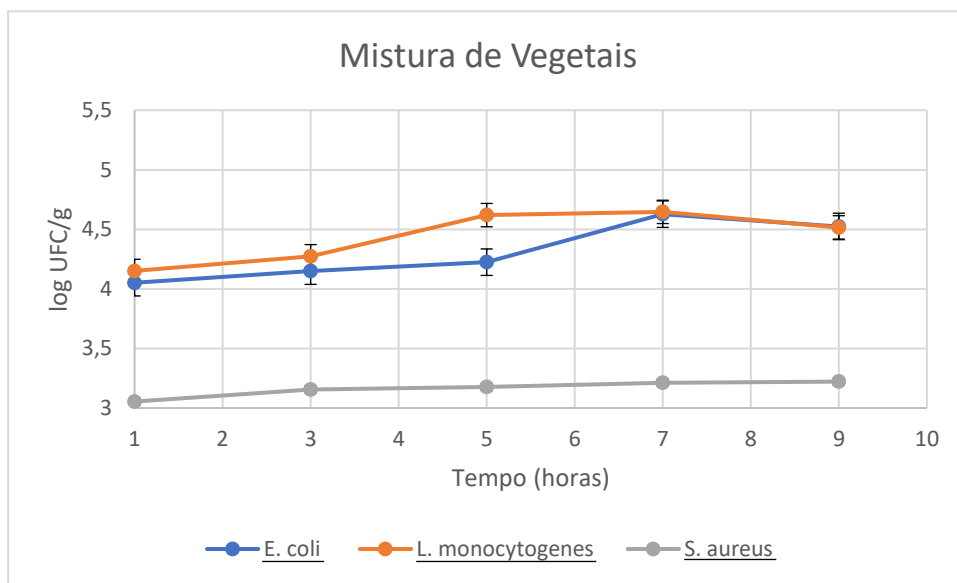


Gráfico 4. Crescimento de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* em Mistura de vegetais ao longo de um período de 9 horas (consultar tabela 1, pertencente ao anexo 1, tabela 1 do anexo 2 e tabela 1 do anexo 3 para valores referentes a *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respetivamente), a temperatura ambiente (18 – 25 °C). δ (*E. coli*) = 0,222118; δ (*L. monocytogenes*) = 0,195861; δ (*S. aureus*) = 0,059967. $P = 3,6E-07$

1.5. Couve-de-bruxelas

L. monocytogenes não foi inoculado em couve-de-bruxelas. *S. aureus* e *E. coli* apresentaram alterações ao longo do período considerado. Os teores oscilaram entre 0,2 e 0,5 log UFC/g apresentando uma tendência de diminuição durante o período de estudo.

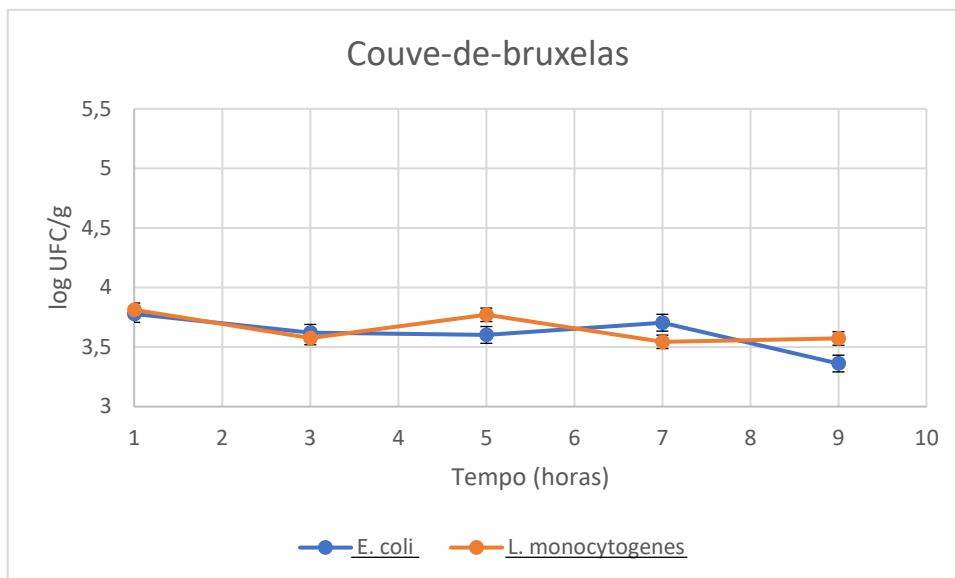


Gráfico 5. Crescimento de *E. coli* e *S. aureus* em couve-de-bruxelas ao longo de 9 horas (consultar tabela 1, pertencente ao anexo 1, e tabela 1 do anexo 3 para valores referentes a *E. coli* e *S. aureus*, respetivamente), a temperatura ambiente (18 – 25 °C). δ (*E. coli*) = 0,140706; δ (*S. aureus*) = 0,112947; p = 0,654802

1.6. Cogumelos

S. aureus e *E. coli* em cogumelos variou apenas entre 0,1 e 0,2 log UFC/g. Por sua vez, *L. monocytogenes* apresentou um aumento de 0,7 log UFC/g.

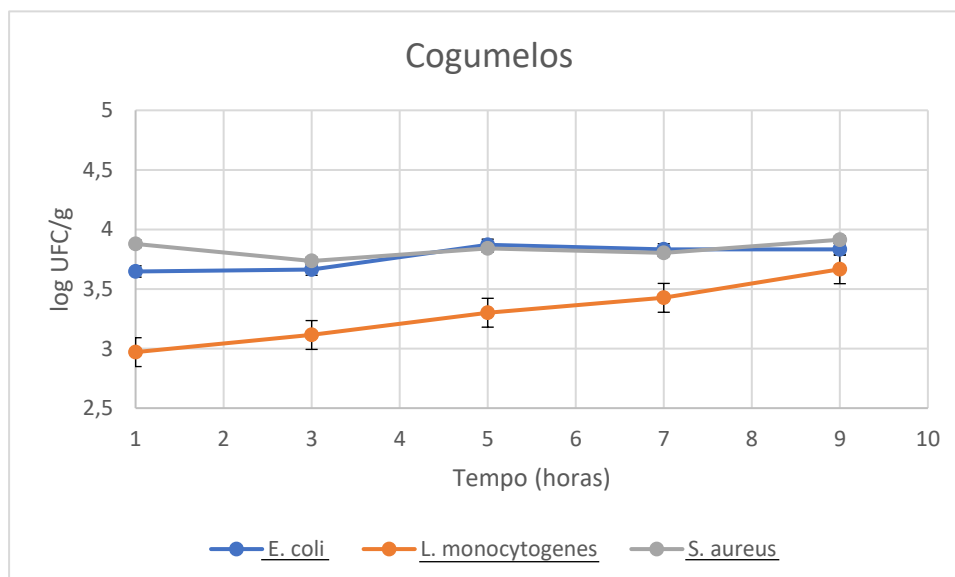


Gráfico 6. Crescimento de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* em cogumelos ao longo de 9 horas (consultar tabela 1, pertencente ao anexo 1, tabela 1 do anexo 2 e tabela 1 do anexo 3 para valores referentes a *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respetivamente), a temperatura ambiente (18 – 25 °C). δ (*E. coli*) = 0,094515; δ (*L. monocytogenes*) = 0,24213; δ (*S. aureus*) = 0,061849; p = 0,000619

1.7. Salmão

E. coli não foi inoculada em salmão, uma vez que não se encontra associada a infeções com origem neste género alimentar (Novoslavskij et al, 2015). *L. monocytogenes* e *S. aureus* apresentaram uma evolução ao longo do tempo muito semelhantes. *L. monocytogenes* nas primeiras 5 horas decresceu cerca de 0,2 log UFC/g. *S. aureus* apresentou uma ligeira subida, de cerca de 0,3 log UFC/g, ao longo do período de incubação.

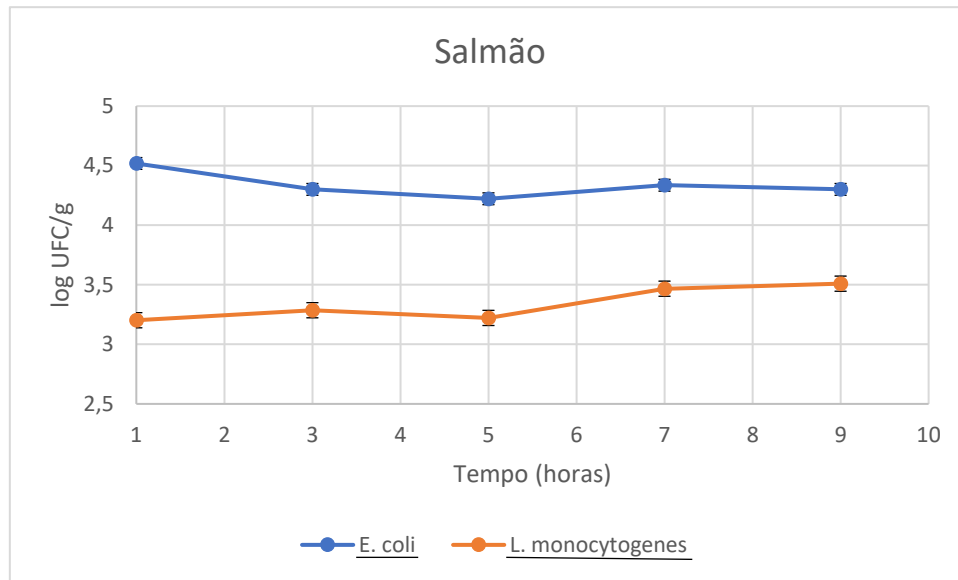


Gráfico 7. Crescimento de *L. monocytogenes* e *S. aureus* em salmão ao longo de 9 horas (consultar tabela 1, pertencente ao anexo 2, tabela 1, anexo 3 para valores referentes a *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respetivamente), a temperatura ambiente (18 – 25 °C). δ (*L. monocytogenes*) = 0,09878; δ (*S. aureus*) = 0,127101; p = 1,67E-06

1.8. Marisco

L. monocytogenes não foi inoculado no preparado de marisco. O teor de *S. aureus* foi estável ao longo do processo de descongelação. No entanto, observou-se um comportamento variável para *E. coli*, após as primeiras 5 horas de análise e obteve-se uma diminuição de 0,3 log UFC/g que foi seguida por uma subida de valor semelhante.

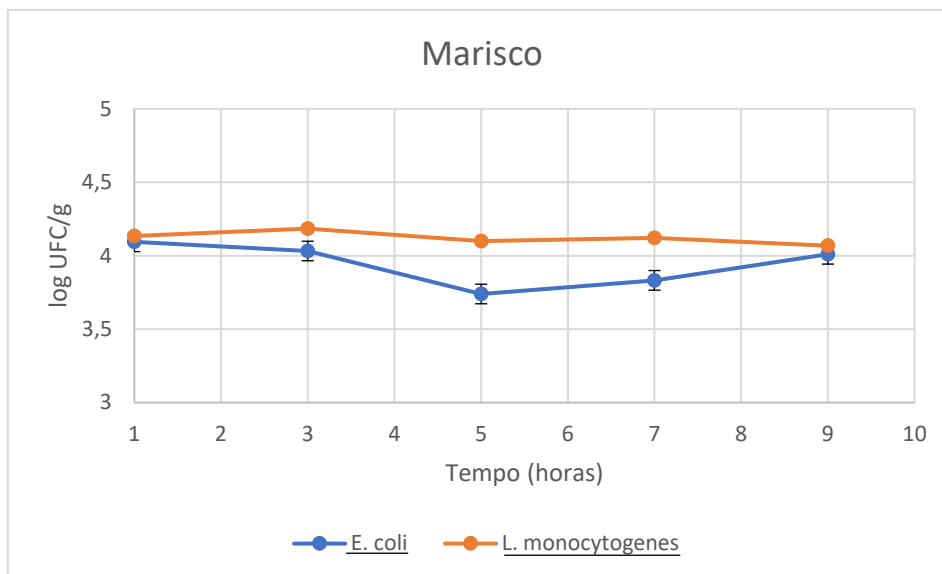


Gráfico 8. Crescimento de *E. coli* e *S. aureus* em marisco ao longo de 9 horas (consultar tabela 1, pertencente ao anexo 1 e tabela 1 do anexo 3 para valores referentes a *E. coli* e *S. aureus*, respetivamente), a temperatura ambiente (18 – 25 °C). δ (*E. coli*) = 0,133408; δ (*S. aureus*) = 0,03854; ρ = 0,032035

1.9. Lulas

L. monocytogenes não foi inoculada neste género alimentar. *E. coli* e *S. aureus* apresentaram um comportamento semelhante. As duas bactérias aumentaram cerca de 0,2 log UFC/g ao longo do procedimento.

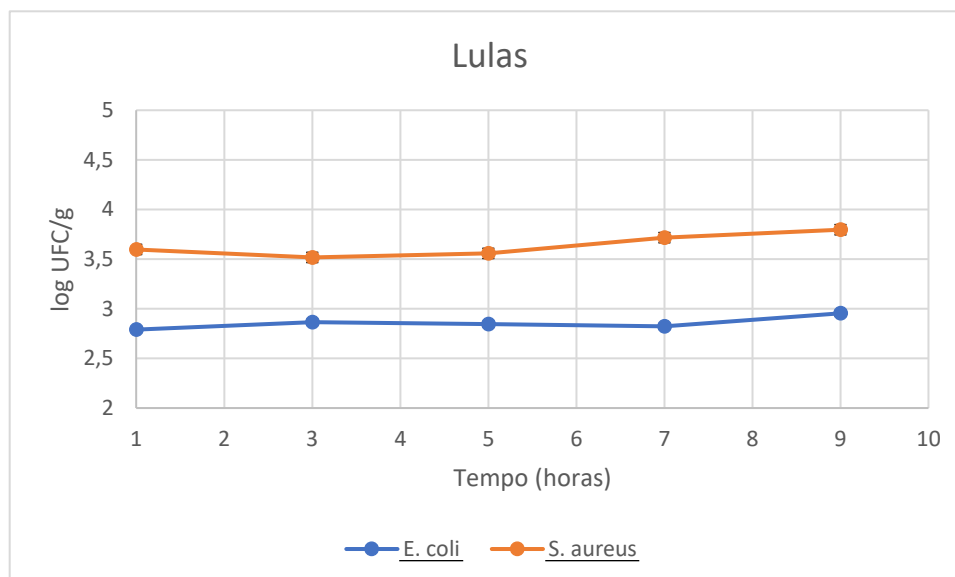


Gráfico 9. Crescimento de *E. coli* e *S. aureus* em lulas ao longo de 9 horas (consultar tabela 1, pertencente ao anexo 1 e tabela 1 do anexo 3 para valores referentes a *E. coli* e *S. aureus*, respetivamente), a temperatura ambiente (18 – 25 °C). δ (*E. coli*) = 0,055201; δ (*S. aureus*) = 0,103872; ρ = 9,38E-07.

A presença de *S. typhimurium* foi detetada em todas as amostras alimentares contaminadas com esta bactéria: peru; frango; mistura de vegetais; salmão; couve-de-bruxelas; cogumelos; marisco; lulas e carne vermelha.

Tabela 3. Comportamento de *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes* ao longo do processo de descongelação a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 9 horas em diversos alimentos. (Nota: ↓ simboliza descida e ↑ subida das contagens populacionais da bactéria.

Alimentos	Microrganismos		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Peru	↓ 0,3 log UFC/g (até 9 horas)	↓ 0,2 log UFC/g (até 7 horas) ↑ 0,3 log UFC/g (até 9 horas)	↔ Manutenção (até 7 horas) ↑ 0,3 log UFC/g (até 9 horas)
Frango	↑ 0,2 log UFC/g (até 9 horas)	↑ 0,2 log UFC/g (até 9 horas)	↑ 0,6 log UFC/g (até 5 horas) ↑ 0,8 log UFC/g (até 9 horas)
Carne Vermelha	----	Manutenção ↔ (até 9 horas)	↑ 0,9 log UFC/g (até 9 horas)
Mistura de vegetais	↑ 0,2 log UFC/g (até 9 horas)	↑ 0,9 log UFC/g (até 9 horas)	↑ 0,9 log UFC/g (até 9 horas)
Couve-de-bruxelas	↓ 0,2 log UFC/g (até 9 horas)	↓ 0,2 log UFC/g (até 9 horas)	----
Cogumelos	↑ 0,1 log UFC/g (até 9 horas)	↑ 0,1 log UFC/g (até 9 horas)	↑ 0,7 log UFC/g (até 9 horas)
Salmão	↑ 0,3 log UFC/g (até 9 horas)	----	↓ 0,2 log UFC/g (até 5 horas) Manutenção

			↔ (até 9 horas)
Marisco	Manutenção ↔ (até 9 horas)	↓ 0,4 log UFC/g (até 9 horas)	----
Lulas	↑ 0,2 log UFC/g (até 9 horas)	↑ 0,2 log UFC/g (até 9 horas)	----

Neste ensaio os microrganismos foram inoculados em simultâneo nos géneros alimentares, o que poderá ter gerado competição bacteriana. Esta facto dificulta a interpretação dos resultados obtidos, pois não é possível distinguir se o comportamento bacteriano é resultado da inibição ou das condições ambientais. A presença de microrganismos num ecossistema pode afetar substancialmente a abundância ou comportamento de um segundo organismo sem interação direta entre os mesmos (Zilelidou et al, 2018). O crescimento de microrganismos patogénicos também é dependente da microflora natural de cada alimento (Dack et al, 1962).

O comportamento de cada microrganismo testado neste variou consoante o alimento considerado. De um modo geral, *L. monocytogenes* apresentou uma maior capacidade de proliferação. *S. aureus* manteve o valor de inóculo inicial, com alterações entre os 0,1 e 0,3 log UFC/g. O comportamento de *E. coli* diferenciou-se entre os géneros alimentares considerados, em algumas situações observou-se um aumento da densidade, na ordem dos 0,5 log UFC/g, enquanto que em outras verificou-se uma diminuição de cerca de 0,2 log UFC/g.

O processo de descongelação a temperatura ambiente do laboratório (18 – 25 °C) durante 9 horas não está previsto pela ISO em vigor (ISO6887), uma vez que a mesma obriga a que as amostras de produtos alimentares se mantenham num período máximo de 3 horas, quando mantido a essa temperatura (ISO 6887-1:2017). Sage et al (1998) observaram que o procedimento de descongelação de rissóis de carne inoculados com *E. coli* O157:H7, a 23 °C é um procedimento que só garante a sua segurança microbiológica até 3 horas, uma vez que, decorrido este período ocorre um rápido crescimento. Estes resultados estão de acordo com a ISO em vigor (Sage et al, 1998). Por outro lado, Ingham et al (2005), observaram que o crescimento de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 ou *S. aureus* em frango e carne vermelha quando submetidos a descongelação durante 9 horas a 22 e 30 °C não aumentou significativamente (Ingham et al, 2005). Os autores concluíram que a descongelação à temperatura ambiente de amostras de frango de dimensões relativamente elevadas durante um período inferior a 9 horas não aumenta o risco de infeção alimentar associado com serotipos de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 ou *S. aureus* (Ingham et al, 2005). Lianou et al (2009), observaram um comportamento semelhante em carne vermelha congelada inoculada com *L. monocytogenes* quando submetida a um

processo de descongelação a 25 °C num período de 12 horas, uma vez que a densidade bacteriana se manteve constante (Lianou et al, 2009).

Tendo em conta os resultados observados neste primeiro ensaio, foi desenhado o plano experimental seguinte de forma a avaliar o desenvolvimento das mesmas estirpes bacterianas durante um período superior (96 horas) a dois valores de temperatura de refrigeração próximos, 1,5 e 4 °C. O objetivo foi avaliar se o transporte das amostras congeladas durante o seu processo de descongelação poderia ser realizado a estas condições durante um período mais longo, em alternativa ao transporte à temperatura ambiente.

Neste segundo ensaio, as amostras alimentares (peru; frango; carne vermelha; mistura de vegetais; cogumelos; lulas; camarão; batatas; pescado) foram contaminadas com *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. typhimurium*, individualmente, tendo sido posteriormente congeladas, por um período máximo de 20 dias, a (-18 °C). De modo a avaliar o comportamento das referidas estirpes bacterianas ao longo do processo de descongelação dos produtos alimentares estes foram submetidos às duas temperaturas de refrigeração 1,5 e 4 °C, tendo a sua análise sido realizada com uma periodicidade de 24 horas num total de 96 horas.

2.1 Peru

As contagens de *S. aureus* variou entre 0,1 e 0,2 log UFC/g e não foi observada diferença estatística significativa ($p= 0,154516$) entre os dois valores de temperatura estudados.

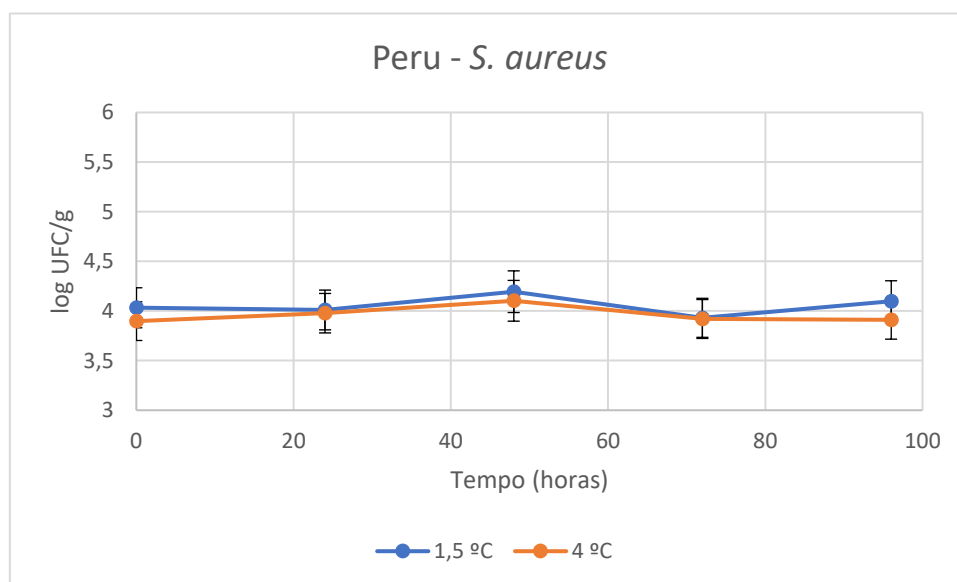


Gráfico 10. Crescimento de *S. aureus* em peru ao longo de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 4, e tabela 1 do anexo 5 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. $\delta (1,5^{\circ}\text{C}) = 0,165832$; $\delta (4^{\circ}\text{C}) = 0,438753$;

Por sua vez, *E. coli* apresentou oscilações ao longo do procedimento e as diferenças entre os dois valores de temperatura foram notórias ($p= 0,003652$). A 1,5 °C nas primeiras 24 horas houve um aumento de 0,5 log UFC/g, verificando-se a partir deste momento uma descida de 0,1 log UFC/g. A 4 °C observou-se uma descida de 0,3 log UFC/g nas primeiras 48 horas e um aumento de 0,4 log UFC/g durante o restante período.

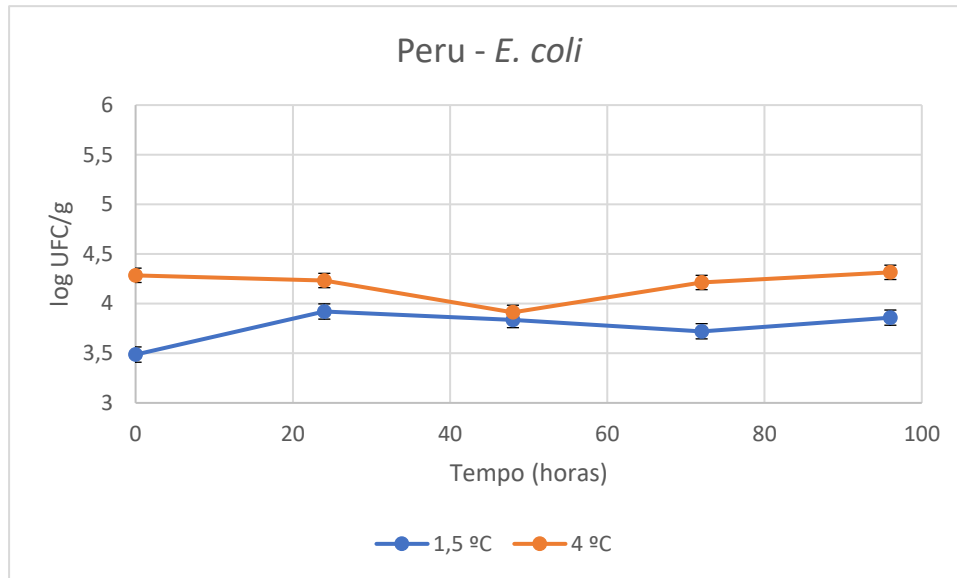


Gráfico 11. Crescimento de *E. coli* em peru ao longo de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 6, e tabela 1 do anexo 7 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. $\delta (1,5^{\circ}\text{C}) = 0,153222$; $\delta (4^{\circ}\text{C}) = 0,144532$;

L. monocytogenes inoculado em peru apresentou um aumento mais pronunciado a 4 °C, embora estatisticamente não exista diferença entre os dois valores de temperatura ($p= 0,053506$). A 1,5 °C obteve-se um aumento da densidade celular em 0,5 log UFC/g e a 4 °C de 1,3 log UFC/g.

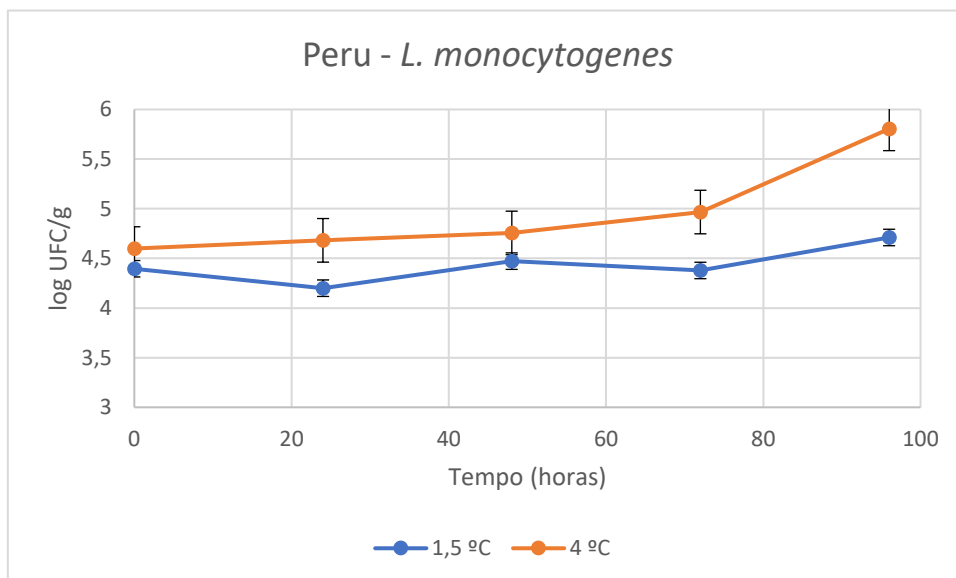


Gráfico 12. Crescimento de *E. coli* em peru ao longo de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 8 e tabela 1 do anexo 9 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. $\delta (1,5^{\circ}\text{C}) = 0,088512$; $\delta (4^{\circ}\text{C}) = 0,075518$;

2.2. Frango

S. aureus em frango apresentou valores estáveis ao longo do período de estudo. No entanto, observou-se diferença estatística ($p= 0,006163$) entre o comportamento a 1,5 e a 4 °C, tendo sido observado um comportamento mais estável para o valor de temperatura mais elevado. No caso do valor de temperatura inferior foi observado alterações nas contagens, entre 0,1 e 0,4 log UFC/g.

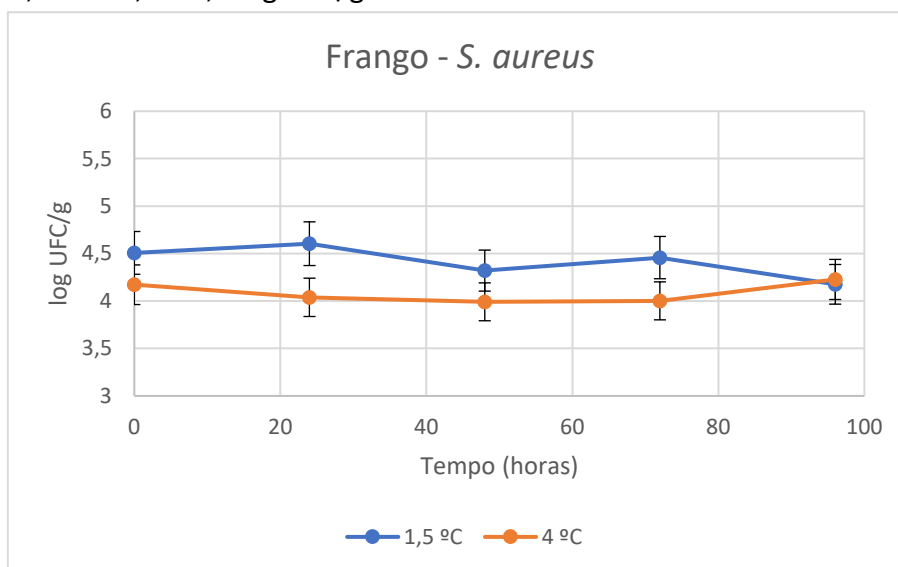


Gráfico 13. Crescimento de *S. aureus* em frango ao longo de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 4 e tabela 1 do anexo 5 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. $\delta (1,5^{\circ}\text{C}) = 0,149602$; $\delta (4^{\circ}\text{C}) = 0,095414$;

E. coli apresentou um comportamento diferente consoante a temperatura utilizada ($p= 0,034404$). Observou-se um aumento constante das contagens da bactéria para o valor de temperatura 1,5 °C, cerca de 0,6 log UFC/g. Pelo contrário, ao ser submetida ao valor superior de temperatura, *E. coli* apresentou variabilidade no seu comportamento. Verificou-se uma descida inicial de cerca de 0,8 log UFC/g, sendo seguida por um aumento de 0,5 log UFC/g e, posteriormente, manutenção destes valores.

Anang et al (2007) observaram um comportamento semelhante ao reportado neste ensaio. Os autores detetaram uma descida nos valores de *E. coli* quando esta foi inoculada em frango e submetida a um armazenamento de 4 °C (Anang et al, 2007). No dia em que a inoculação ocorreu, as contagens de *E. coli* apresentavam 7,3 log UFC/g, tendo diminuído após 5 dias para 7,14 log CFU/g (Anang et al, 2007).

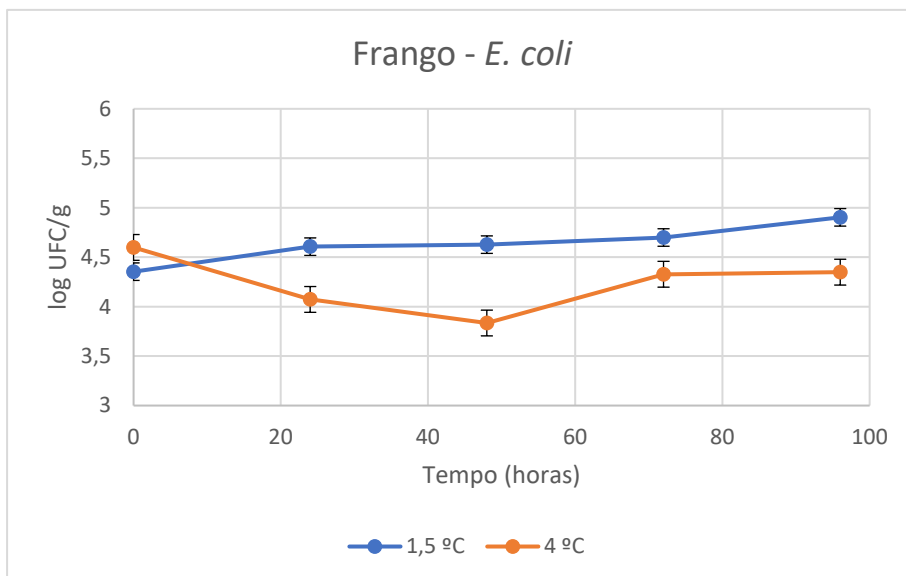


Gráfico 14. Crescimento de *E. coli* em frango ao longo de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 7, e tabela 1 do anexo 6 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. $\delta (1,5^{\circ}\text{C}) = 0,176685$; $\delta (4^{\circ}\text{C}) = 0,260926$;

L. monocytogenes aumentou ao longo das 96 horas de análise. Quando submetida a um valor de temperatura de 1,5 °C, ocorreu um aumento de cerca de 1 log UFC/g e a 4 °C subiu 0,5 log UFC/g. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os dois valores de temperatura considerados ($p= 0,005782$) e, contrariamente ao previsto, os melhores resultados foram observados a 4 °C.

Anang et al (2007), observaram um aumento semelhante para *L. monocytogenes* quando inoculada em frango e armazenada sob a mesma temperatura num período semelhante (Anang et al, 2007).

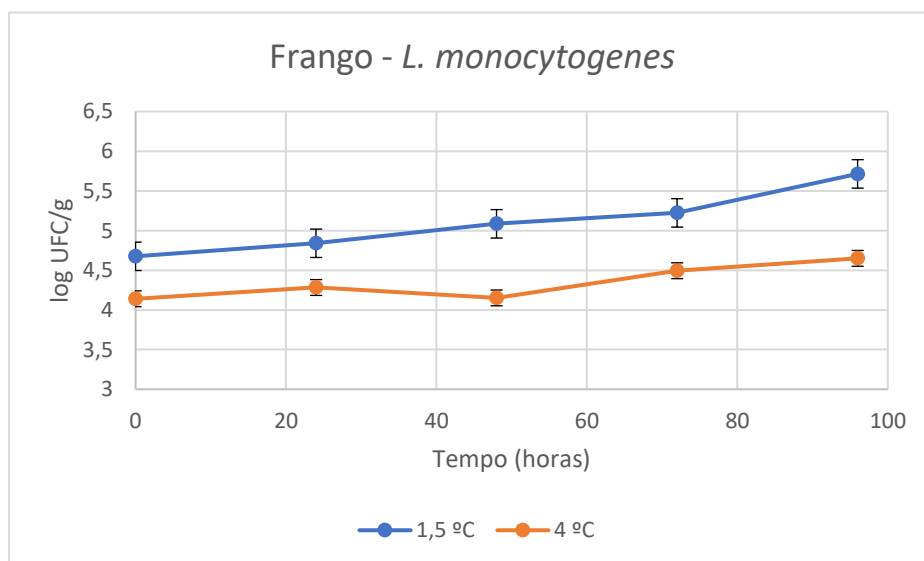


Gráfico 15. Crescimento de *L. monocytogenes* em Frango ao longo de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 8 e tabela 1 do anexo 9 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente $\delta (1,5^{\circ}\text{C}) = 0,357784$; $\delta (4^{\circ}\text{C}) = 0,199309$;

2.3. Carne vermelha

S. aureus inoculado em carne vermelha apresentou uma descida da densidade populacional nas duas temperaturas testadas, sendo esta mais acentuada a 1,5 °C, cerca de 0,3 log UFC/g. A 4 °C o valor foi de 0,2 log UFC/g. Não se verificou diferença estatística significativa entre as duas temperaturas ($p = 0,949643$).

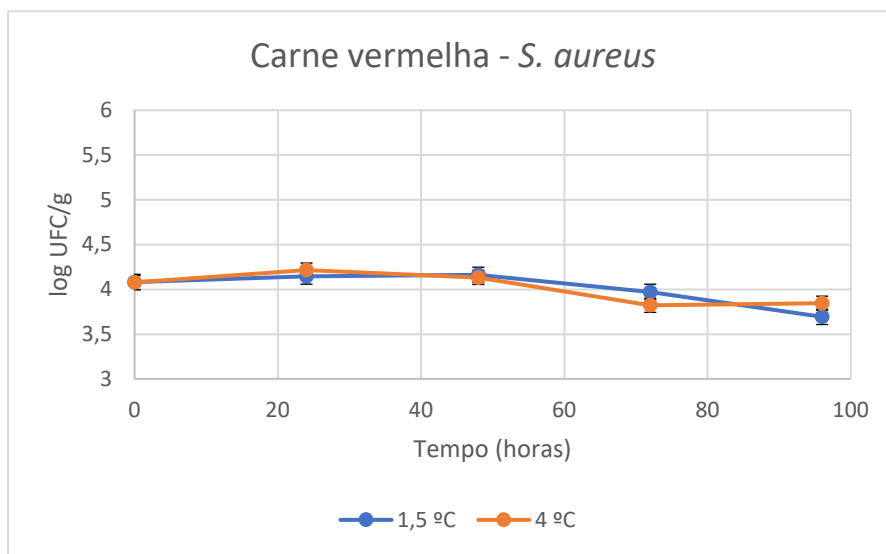


Gráfico 16. Crescimento de *S. aureus* em Carne vermelha ao longo de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 4 e tabela 1 do anexo 5 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. $\delta (1,5^{\circ}\text{C}) = 0,171979$; $\delta (4^{\circ}\text{C}) = 0,157213$;

E. coli apresentou comportamentos diferentes quando submetidos a 1,5 e 4 °C ($p = 0,000527$). Para o valor de temperatura superior houve diminuição da bactéria em cerca de 0,3 log UFC/g. A 1,5 °C ocorreu um aumento das contagens de 0,2 log UFC/g. Assim sendo, 4 °C conferiu uma maior estabilidade de *E. coli*, uma vez que se caracterizou por um comportamento constante.

Barkocy-gallagher et al (2002), desenharam um estudo para monitorizar a densidade de 5 estirpes geneticamente diferentes de *E. coli* O157, em carne vermelha, a diferentes temperaturas de armazenamento. Conclui-se que existia variação no comportamento entre estirpes (Barkocy-gallagher et al, 2002). Quando submetida a 4 °C, *E. coli* aumentou após 14 dias, embora tenham ocorrido diminuições no número de células no período inicial de análise, tal como se verificou no presente estudo (Barkocy-gallagher et al, 2002). Resultados semelhantes foram observados por Kereluk et al (1960), uma vez que afirmaram que as contagens de *E. coli* inoculada em tarte de carne diminui a 5 °C e permaneceram constante a 0 °C e a -13 °C após 30 dias (Kereluk et al, 1960).

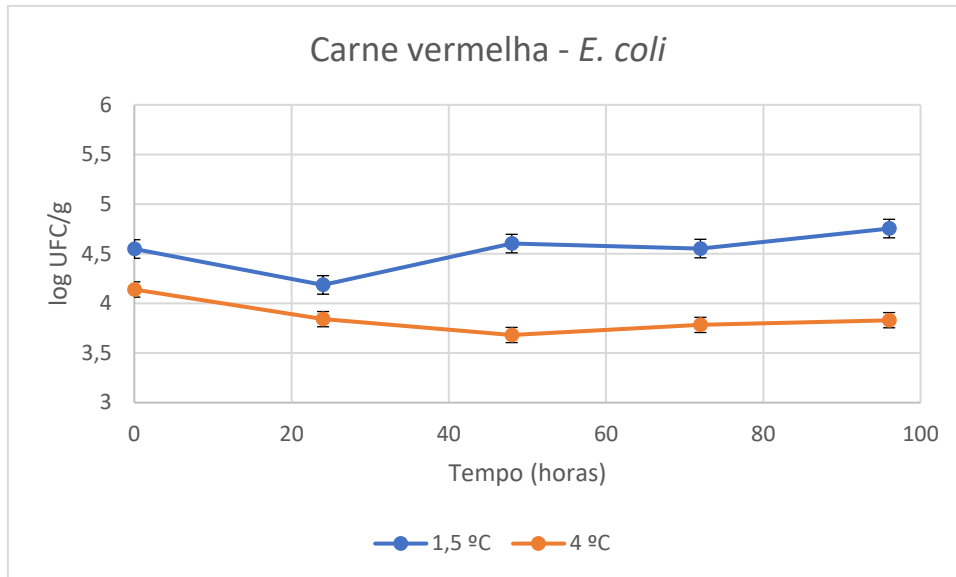


Gráfico 17. Crescimento de *E. coli* em carne vermelha ao longo de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 6 e tabela 1 do anexo 7 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. $\delta (1,5^{\circ}\text{C}) = 0,186788$; $\delta (4^{\circ}\text{C}) = 0,153195$;

L. monocytogenes apresentou o mesmo comportamento a 1,5 e a 4 °C ($p = 0,717546$), caracterizando-se o valor superior por uma subida de cerca de 0,5 log UFC/g, o que não se observou no valor inferior de temperatura.

Lianou et al (2009) mostraram que o teor de *L. monocytogenes* em carne não foi afetado pelo tratamento de congelação/dcongelação (Lianou et al, 2009). O mesmo estudo mostrou que um valor de temperatura inferior confere uma menor alteração de populações microbianas, o que vai de encontro aos resultados obtidos no presente trabalho para o frango e carne vermelha, embora o mesmo não se tenha verificado para o peru (Lianou et al, 2009).

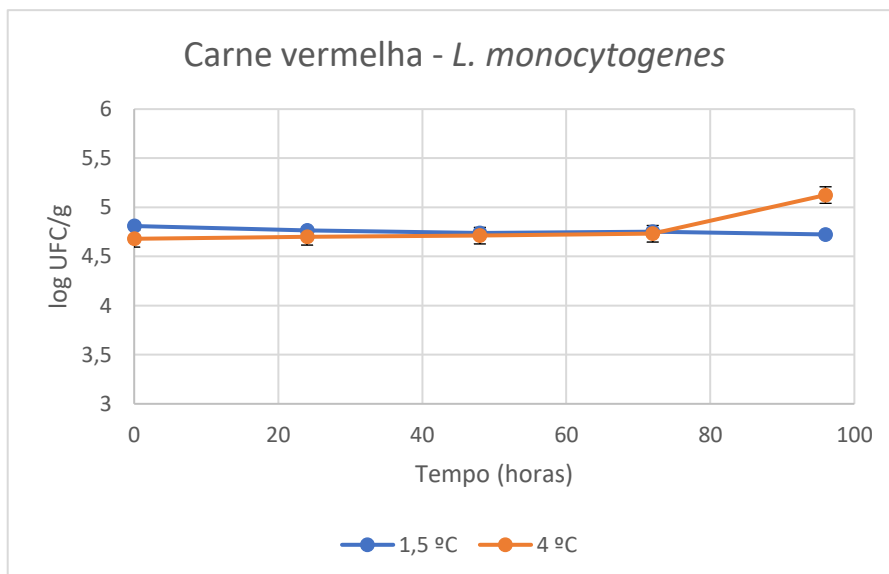


Gráfico 18. Crescimento de *L. monocytogenes* em carne vermelha ao longo de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 8, e tabela 1 do anexo 9 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. δ (1,5°C) = 0,029354; δ (4°C) = 0,168466;

2.4. Mistura de vegetais

Observou-se um comportamento semelhante de *S. aureus* nas duas temperaturas testadas, não se verificando diferença estatística significativa ($p= 0,982204$). A 1,5 °C ocorreu uma descida da densidade de 0,5 log UFC/g até às 72 horas, observando-se de seguida um aumento de 0,4 log UFC/g. Por sua vez, à temperatura mais elevada observaram-se algumas oscilações, entre 0,1 e 0,3 log UFC/g.

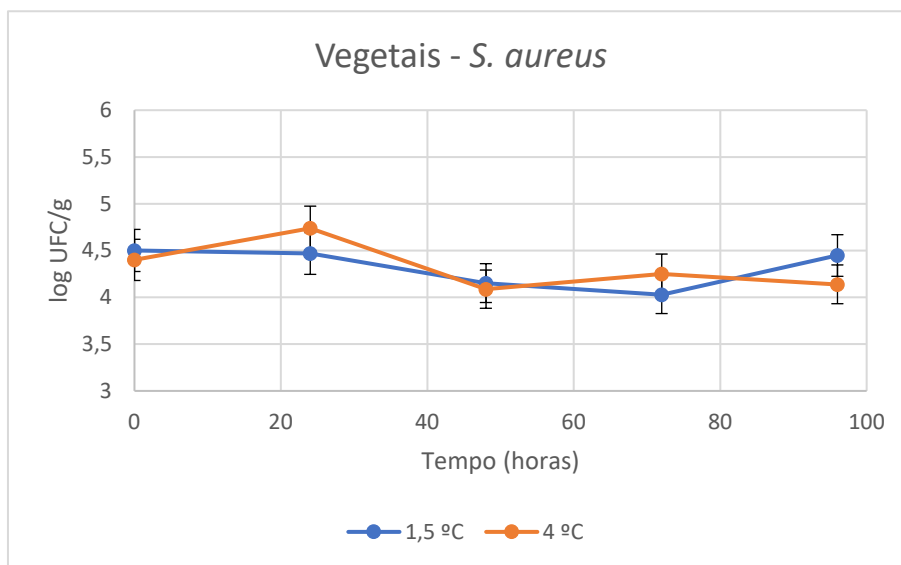


Gráfico 19. Crescimento de *S. aureus* em mistura de vegetais ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 4 e tabela 1 do anexo 5 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. δ (1,5 °C) = 0,192082; δ (4°C) = 0,23349;

O comportamento de *E. coli* quando inoculado em mistura de vegetais diferiu para as duas variáveis consideradas. A 1,5 °C foi observada a manutenção da densidade da bactéria. A 4 °C houve uma descida acentuada, de cerca de 1,1 log UFC/g até às 72 horas, sendo o valor mantido durante o restante período.

Raccach et al (2008) conduziram um estudo cujo objetivo consistia em avaliar os efeitos de congelação e descongelação de alimentos para bebés inoculados com *E. coli*, sendo estes géneros alimentares compostos por vegetais, nomeadamente milho e ervilhas, e fruta (Raccach et al, 2008). Os alimentos foram descongelados a uma temperatura de refrigeração e foi observada uma descida da população bacteriana no mesmo período do que o observado neste estudo (Raccach et al, 2008). O comportamento de *E. coli* variou

consoante o alimento, a fruta providenciou maior criopreservação do que os restantes alimentos, provavelmente devido à elevada presença de hidratos de carbono complexos não fibrados neste alimento quando comparado com as ervilhas e milho (Raccach et al, 2008).

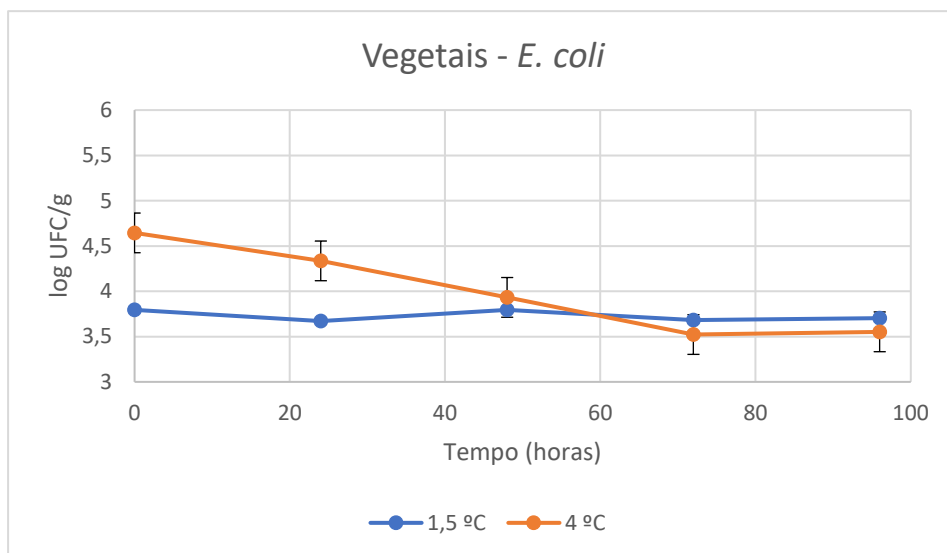


Gráfico 20. Crescimento de *E. coli* em Mistura de vegetais ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 4 e tabela 1 do anexo 6 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. $\delta (1,5^{\circ}\text{C}) = 0,054501$; $\delta (4^{\circ}\text{C}) = 0,438425$;

O comportamento de *L. monocytogenes* foi semelhante nas duas temperaturas testadas, não havendo diferença estatística ($p = 0,938807$). O valor de refrigeração inferior conferiu estabilidade até às 72 horas, tendo ocorrido variação na ordem dos 0,1 log UFC/g, que foi seguida por um aumento de 1,5 log UFC/g. A segunda condição de temperatura caracterizou-se por uma descida de 0,5 log UFC/g nas primeiras 48 horas e, após este período as concentrações aumentaram consideravelmente, cerca de 1,3 log UFC/g.

Pinton et al (2020) avaliou o crescimento de *L. monocytogenes* em brócolos e couve-flor durante 10 dias a 4 °C e verificou que nestas condições o agente patogénico se manteve estável, com uma alteração mínima, mantendo uma concentração de $2,9 \pm 0,2$ log UFC/g (Pinton et al, 2020). Este valor é distinto dos apresentados no presente estudo, no entanto, é necessário ter em conta que os vegetais considerados não são os mesmos. O comportamento dos microrganismos varia de acordo com as características da superfície, como irregularidades, microflora, pH, estrutura, entre outras (Pinton et al, 2020). É também importante perceber qual a capacidade de o ambiente/alimento manter um determinado teor, capacidade esta que varia, uma vez que irá depender dos nutrientes disponíveis, da forma, da superfície, entre outros (Pinton et al, 2020). As taxas de crescimento de *L. monocytogenes* em brócolos e couve-flor aumentam com a temperatura de armazenamento, com as taxas de crescimento mais elevadas observados à temperatura ambiente (Pinton et al, 2020). Uma tendência semelhante foi observada em aipo com taxas de crescimento a aumentar com a subida das temperaturas de armazenamento (4, 12 e 22 °C) (Pinton et al, 2020).

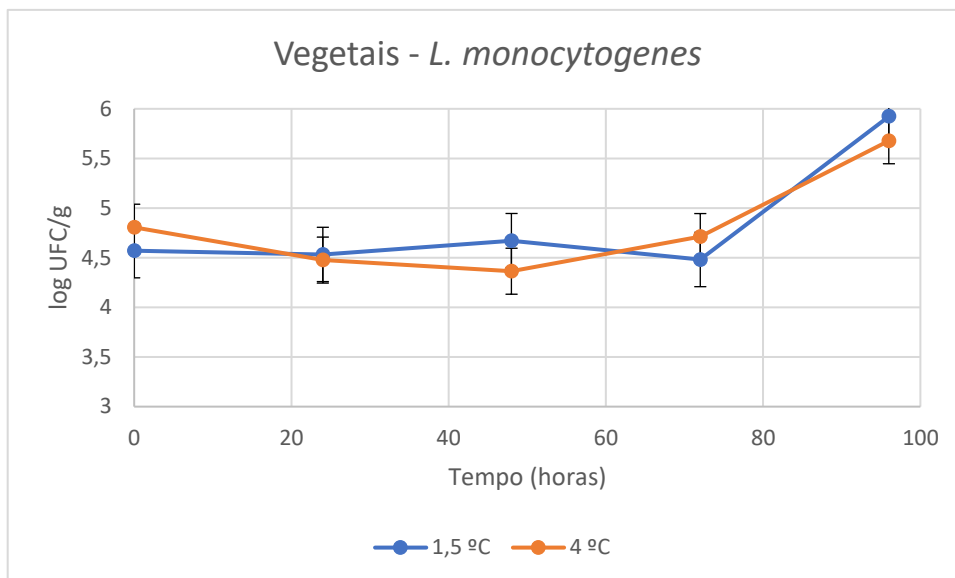


Gráfico 21. Crescimento de *L. monocytogenes* em Mistura de vegetais ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 4 e tabela 1 do anexo 9 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respectivamente. δ (1,5°C) = 0,54732; δ (4°C) = 0,463246;

2.5. Batatas

S. aureus em batatas submetidas a processo de descongelação a 1,5 e a 4 °C apresentaram um comportamento quase idêntico ($p= 0,58411$), caracterizado por uma manutenção das contagens, apresentando pequenas variações, na ordem dos 0,1 log UFC/g.

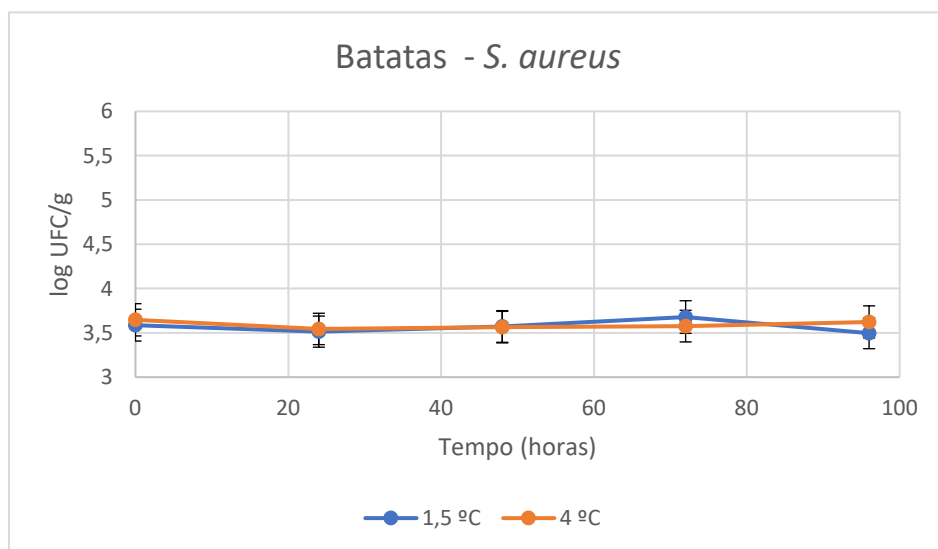


Gráfico 22. Crescimento de *S. aureus* em Batatas ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 4 e tabela 1 do anexo 5 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respectivamente. δ (1,5°C) = 0,064209; δ (4°C) = 0,038181;

E. coli apresentou também um comportamento semelhante nas duas temperaturas ($p= 0,667638$). A 1,5 °C observou-se uma descida nas contagens da população de 0,3 log UFC/g

e no restante período ocorreram alterações de 0,2 log UFC/g. A 4 °C não se observou modificação na densidade celular da espécie *E. coli* até às 72 horas, ocorrendo uma subida de 0,8 log UFC/g no restante período.

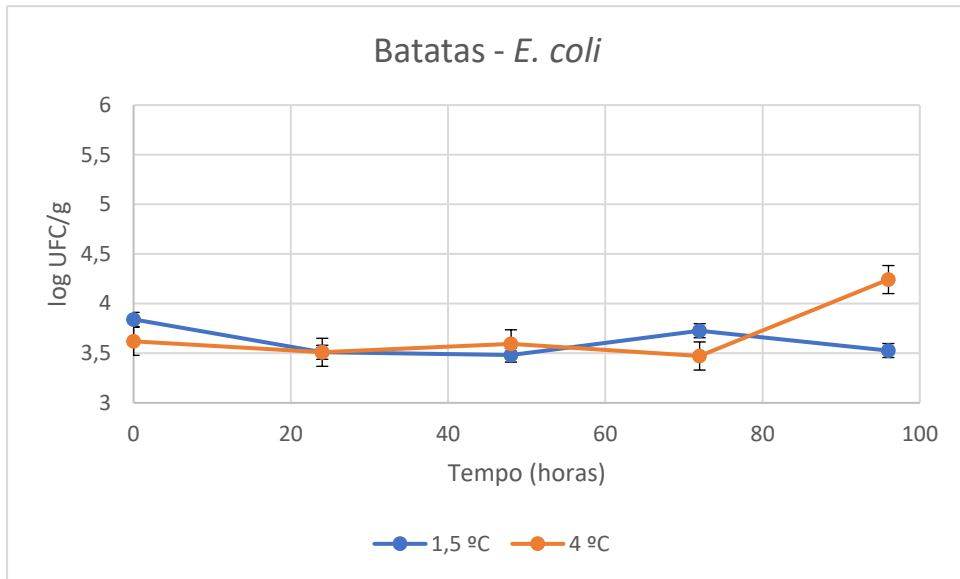


Gráfico 23. Crescimento de *E. coli* em Batatas ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 7 e tabela 1 do anexo 6 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. δ (1,5°C) = 0,141481; δ (4°C) = 0,282433;

O comportamento de *L. monocytogenes* em batatas foi muito semelhante nas duas temperaturas testadas ($p= 0,280306$). O valor de temperatura superior conferiu um maior aumento das contagens a partir das 72 horas, cerca de 1 log UFC/g. À temperatura inferior houve uma descida de 0,3 log UFC/g nas primeiras 48 horas, seguida por um aumento de 0,4 log UFC/g.

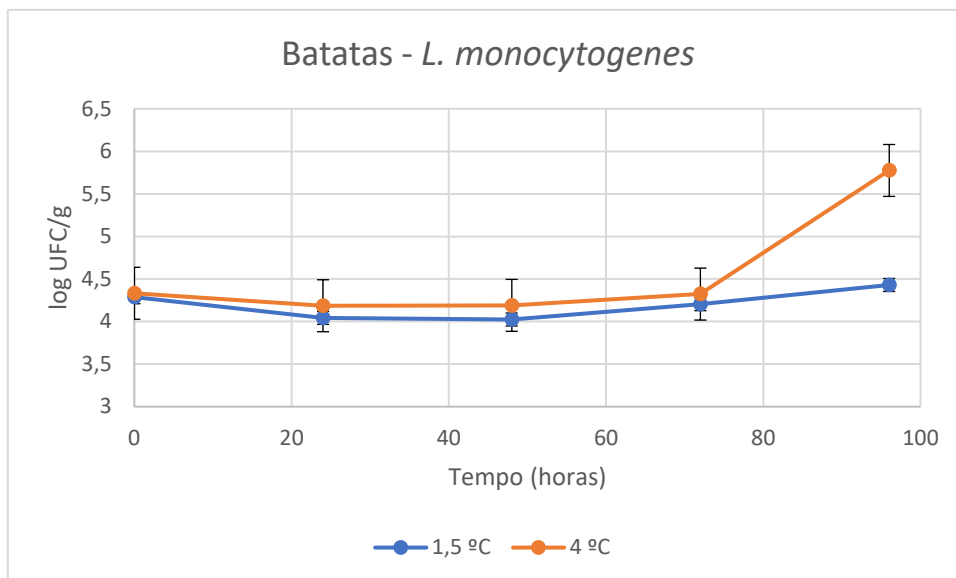


Gráfico 24. Crescimento de *L. monocytogenes* em Batatas ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 7 e tabela 1 do anexo 9 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. δ (1,5°C) = 0,152199; δ (4°C) = 0,610376;

2.6. Cogumelos

O comportamento de *S. aureus* variou consideravelmente consoante a temperatura de descongelação a que o alimento foi submetido ($p= 0,016663$). A 1,5 °C o microrganismo manteve-se estável até às 48 horas, observando-se, de seguida, uma diminuição de cerca de 0,3 log UFC/g, e posteriormente um novo aumento, de cerca de 0,1 log UFC/g. A 4 °C verificou-se um aumento constante das contagens de *S. aureus*, apresentando um aumento de cerca de 0,7 log UFC/g após 96 horas.

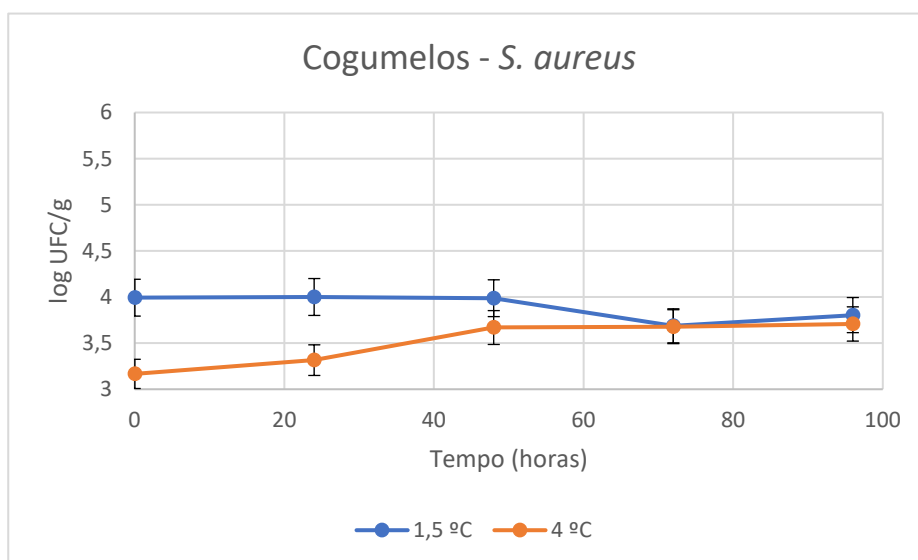


Gráfico 25. Crescimento de *S. aureus* em Cogumelos ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 4, e tabela 1 do anexo 5 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. δ (1,5°C) = 0,126849; δ (4°C) = 0,222982;

Não existe diferença estatística no comportamento de *E. coli* em cogumelos entre as duas temperaturas ($p=0,28929$). Ambas as situações caracterizam-se por uma descida abrupta das contagens celulares, cerca de 2 log UFC/g a 1,5 °C e de 3,3 log UFC/g a 4 °C.

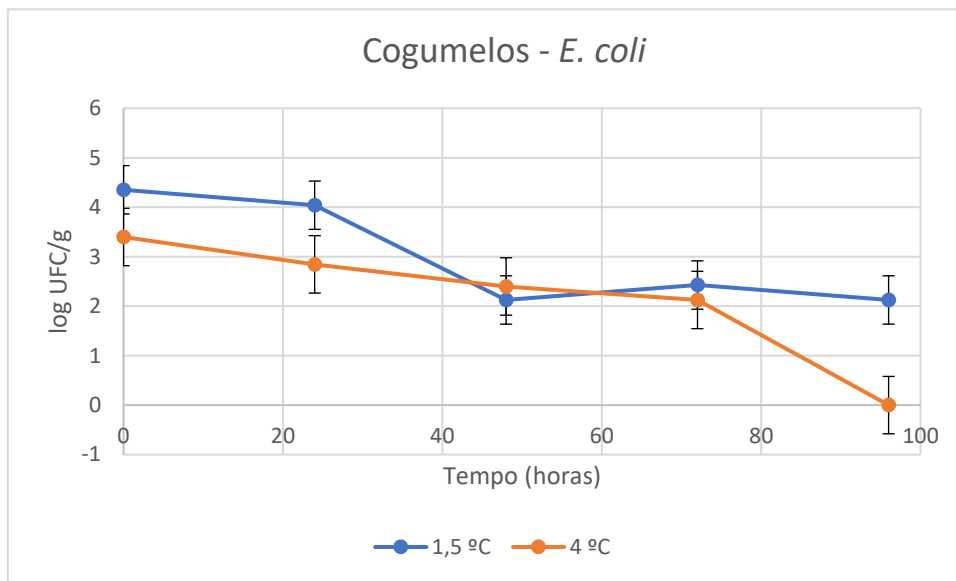


Gráfico 26. Crescimento de *S. aureus* em Cogumelos ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 5 e tabela 1 do anexo 5 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente δ (1,5° C) = 0,976573; δ (4°C) = 1,159747;

Observou-se uma diferença significativa no comportamento de *L. monocytogenes* em cogumelos quando estes foram submetidos a temperaturas de descongelação diferentes ($p= 2,15E-06$). A 1,5 °C o microrganismo diminui a sua densidade em cerca de 0,4 log UFC/g e a 4 °C aumentou cerca de 0,3 log UFC/g, após 96 horas.

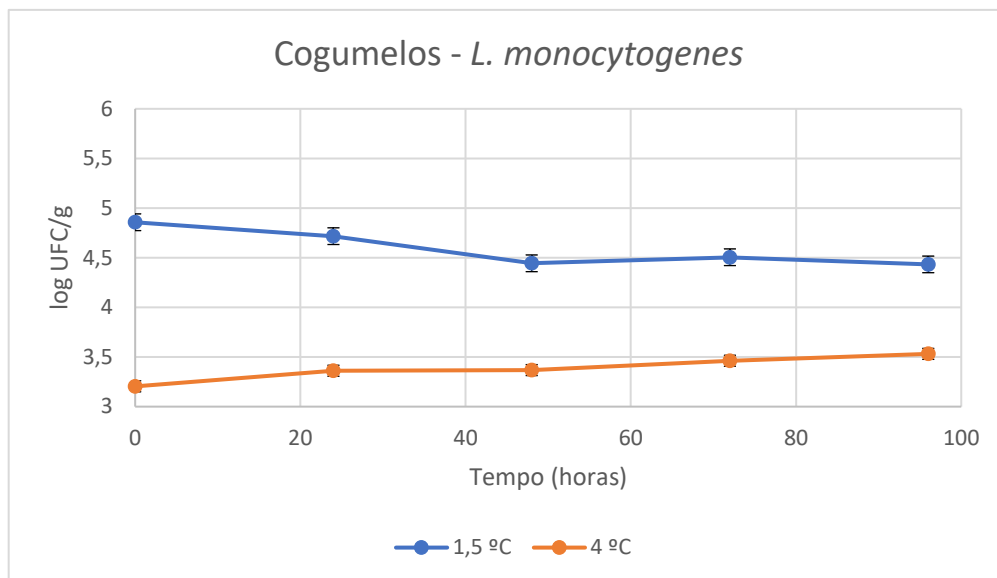


Gráfico 27. Crescimento de *L. monocytogenes* em Cogumelos ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 6 e tabela 1 do anexo 9 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. δ (1,5°C) = 0,16787; δ (4°C) = 0,110448;

2.7. Camarão

O comportamento de *S. aureus* a 1,5 e 4 °C foi semelhante ($p= 0,063197$). Observou-se um aumento das contagens em cerca de 0,4 log UFC/g após 96 horas quando submetido a 4 °C. A 1,5 °C ocorreu uma descida de 0,2 log UFC/g até 72 horas que foi seguido por um aumento de 0,6 log UFC/g.

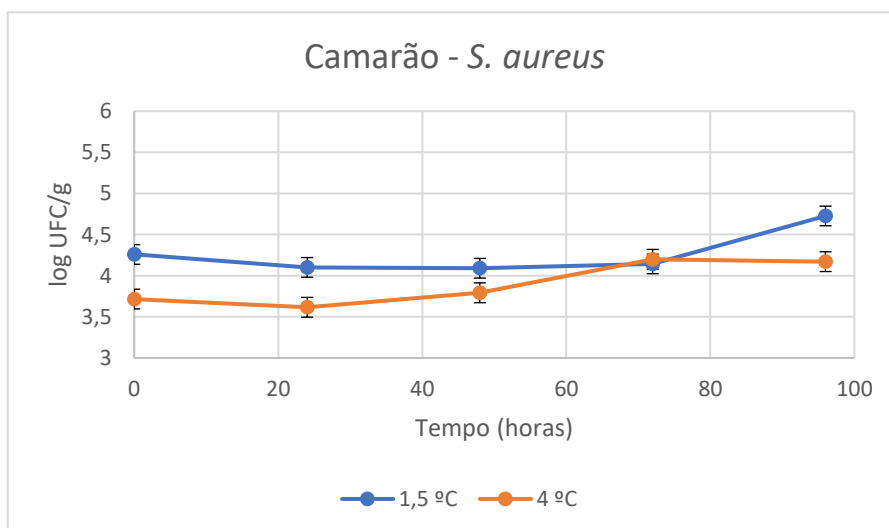


Gráfico 28. Crescimento de *S. aureus* em Camarão ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 4 e tabela 1 do anexo 5 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. δ (1,5°C) = 0,238783; δ (4°C) = 0,240512;

No caso de *E. coli* observou-se concordância de comportamento nas duas situações testadas ($p= 0,951465$). A densidade diminuiu mais acentuadamente, cerca de 1 log UFC/g, à temperatura mais baixa. A 4 °C a diminuição foi de cerca de 0,4 log UFC/g nas primeiras 48 horas, sendo seguida por um aumento de 0,2 log UFC/g.

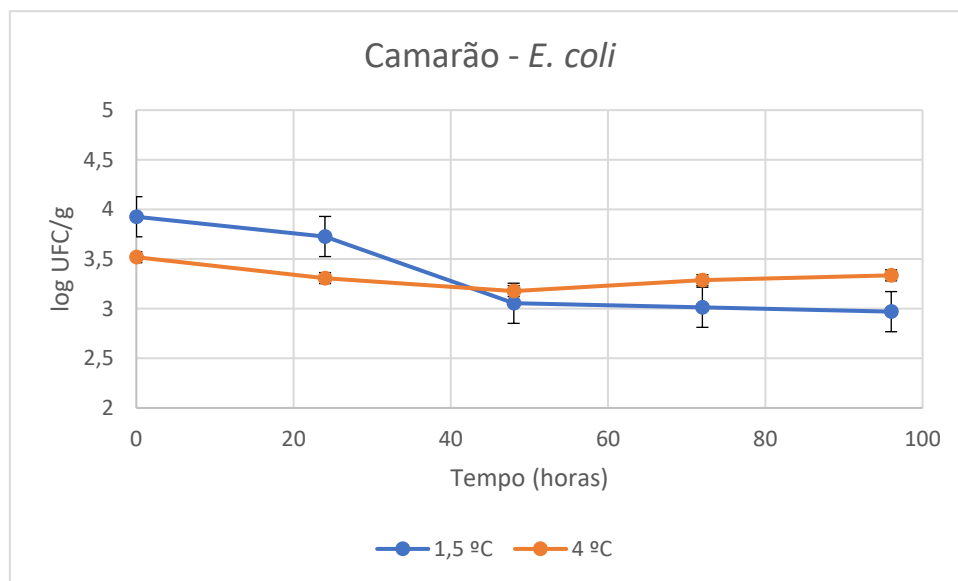


Gráfico 29. Crescimento de *E. coli* em Camarão ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 7 e tabela 1 do anexo 6 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. δ (1,5°C) = 0,404409; δ (4°C) = 0,110665;

L. monocytogenes apresentou o mesmo comportamento nas duas temperaturas ($p= 0,579424$). Houve um aumento nas contagens da bactéria que se tornaram mais evidentes após 24 horas. Os valores aumentaram cerca de 1,5 log e 2,2 log UFC/g para 1,5 e 4 °C, respetivamente.

Kataoka et al (2017) estudaram o comportamento de *L. monocytogenes* em quatro alimentos diferentes (camarão, caranguejo, milho e ervilhas) a 4 °C ao longo de 480 horas (Kataoka et al, 2017). Concluíram que o crescimento em camarão e caranguejo atingiu valores superiores quando comparado com milho e ervilhas (Kataoka et al, 2017). No presente trabalho verificou-se um comportamento semelhante, uma vez que, *L. monocytogenes* se desenvolveu mais rapidamente em camarão, sendo as diferenças significativas após 24 horas (superiores a 0,5 log) e na mistura de vegetais esta alteração só se verificou após 72 horas (Kataoka et al, 2017). Foi também concluído que com o aumento de temperatura a taxa de crescimento aumentou para todos os tipos de alimentos (Kataoka et al, 2017). Tal não foi observado no presente estudo, podendo a pequena diferença nos valores de temperatura utilizados ser a razão.

Por outro lado, Brackett et al (1990) estudou o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em lagosta e camarão durante a descongelação destes produtos a 5 e 10 °C (Brackett et al, 1990). Verificou-se uma descida nas contagens nos dois primeiros dias (Brackett et al, 1990). Este fenómeno poderá dever-se ao facto de as temperaturas de refrigeração utilizadas por Brackett et al (1990) serem mais elevadas, o que dificulta a adaptação das células bacterianas (Brackett et al, 1990). O crescimento foi muito mais rápido a 10 °C do que a 5 °C (Brackett et al, 1990). Ao fim de 8 dias, a 10 °C o valor da população bacteriana atingiu 8,5 log UFC/g enquanto que o correspondente a 5 °C foi de apenas 4,4 log UFC/g (Brackett et al, 1990)

Weerakkody et al (2011), reportou crescimento de *L. monocytogenes* em camarão a 4 °C, com o aumento de cerca de 1 log UFC/g em 4 dias de armazenamento nas mesmas condições de temperatura (Weerakkody et al, 2011).

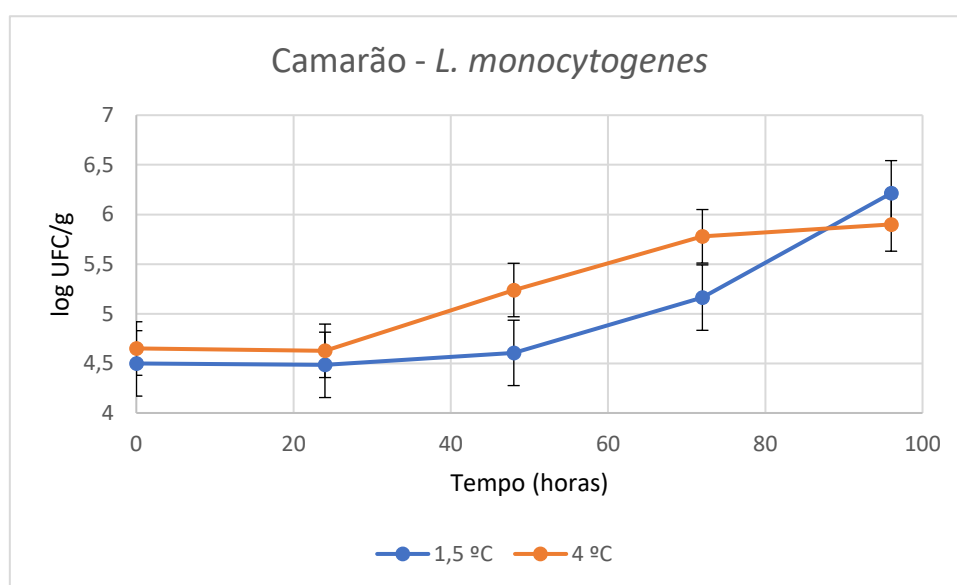


Gráfico 30. Crescimento de *L. monocytogenes* em Camarão ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 7 e tabela 1 do anexo 9 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. δ (1,5°C) = 0,658669; δ (4°C) = 0,538892;

2.8. Lulas

O comportamento de *S. aureus* em lulas em processo de descongelação só foi observado para o valor de temperatura 1,5 °C. Este caracterizou-se por uma descida inicial das contagens de cerca de 0,3 log UFC/g que foi seguido por um aumento de 0,7 log UFC/g.

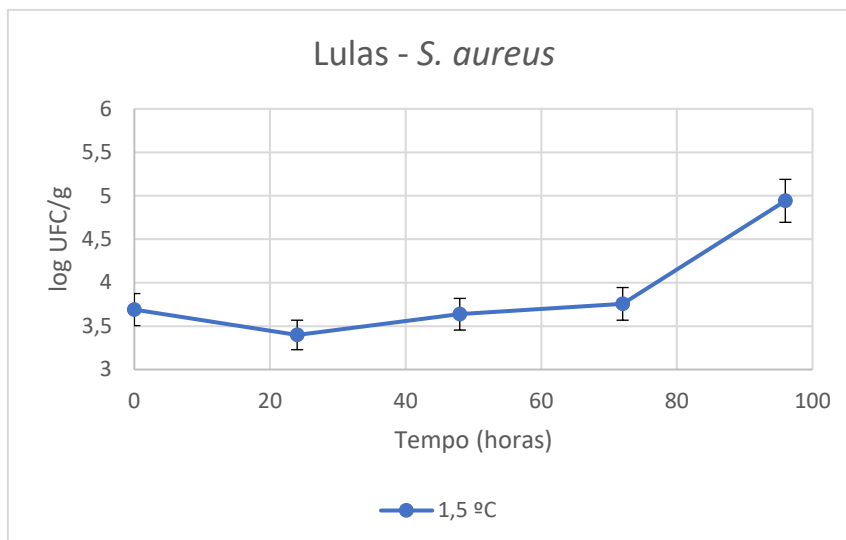


Gráfico 31. Crescimento de *S. aureus* em Lulas ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 4 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 °C $\delta (1,5^{\circ}\text{C}) = 0,542046$;

E. coli apresentou um comportamento semelhante às duas temperaturas testadas ($p=0,191078$). Houve uma descida inicial das contagens na ordem dos 0,3 log UFC/g até às 72 e 48 horas, a 1,5 e 4 °C, respectivamente, e um aumento posterior de 0,3 log UFC/g.

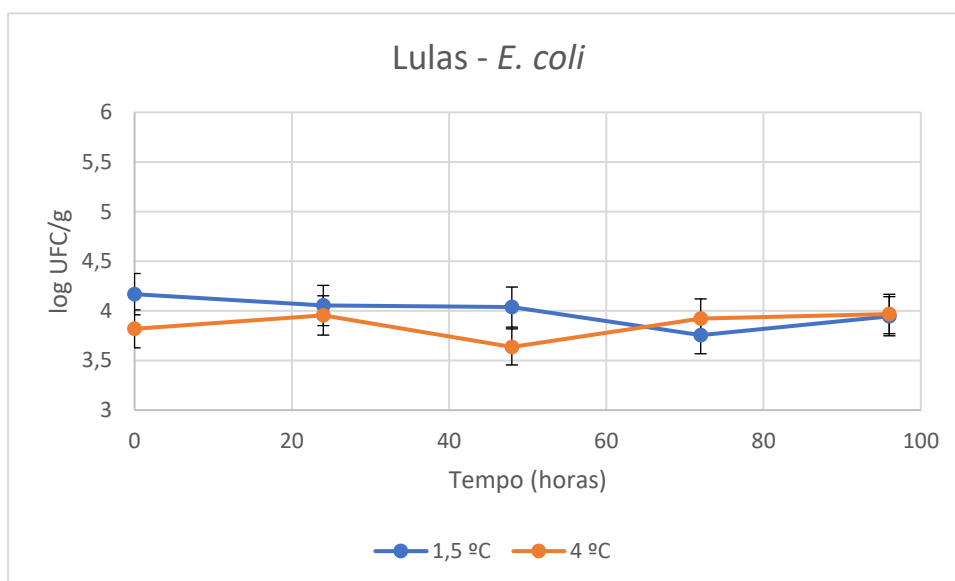


Gráfico 32. Crescimento de *E. coli* em Lulas ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 7 e tabela 1 do anexo 6 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respectivamente. $\delta (1,5^{\circ}\text{C}) = 0,13785$; $\delta (4^{\circ}\text{C}) = 0,12353$;

L. monocytogenes mostrou um comportamento semelhante nas duas temperaturas de descongelação testadas ($p=0,079633$). Até às 48 horas o microrganismo manteve a sua densidade populacional, ocorrendo um aumento significativo após este período, cerca de 1,5 log UFC/g e 0,5 UFC/g em 1,5 e 4 °C, respectivamente.

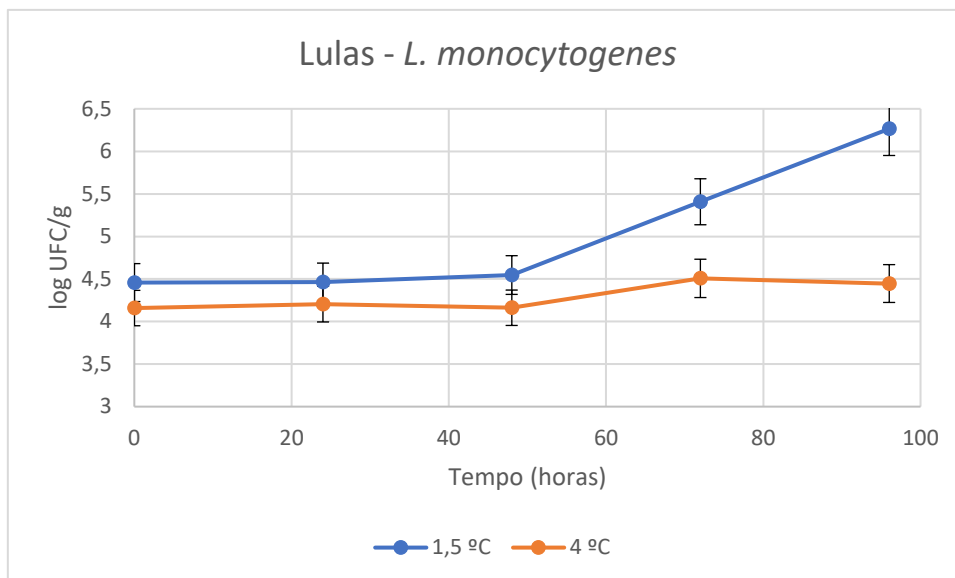


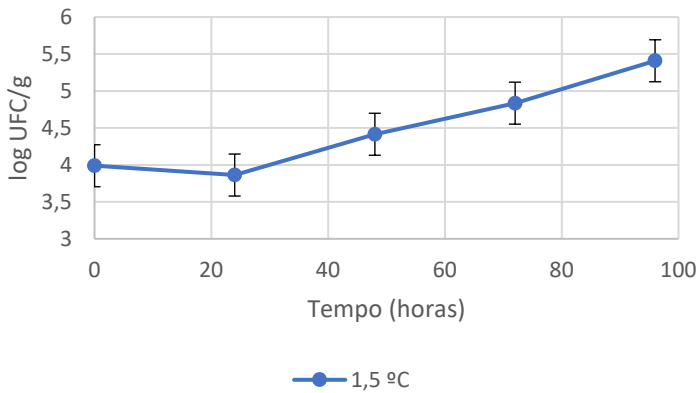
Gráfico 33. Crescimento de *L. monocytogenes* em Lulas ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 8 e tabela 1 do anexo 9 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 e 4 °C, respetivamente. δ (1,5°C) = 0,713992; δ (4°C) = 0,149954;

2.9. Pescado

O pescado só foi inoculado com *L. monocytogenes* e somente submetido a uma temperatura de descongelação a 1,5 °C, por impossibilidade prática. Numa primeira amostra a bactéria diminuiu ligeiramente a sua densidade nas primeiras 24 horas e foi observado no restante período um aumento de cerca de 1,5 log UCF/g. Na segunda situação a bactéria apresentou um comportamento variável, caracterizado por uma descida mínima seguida por uma subida, de cerca de 0,5 log UFC/g, e no último período de 24 horas foi observada uma descida (0,4 log UFC/g).

Liu et al (2016) verificou um aumento muito acentuado de *L. monocytogenes* em atum quando submetido a condições de refrigeração 5-7 °C, observando-se valores superiores a 3-4 log após 14 dias de armazenamento independentemente dos níveis de inoculação (Liu et al, 2016).

Pescado 1



Pescado 2

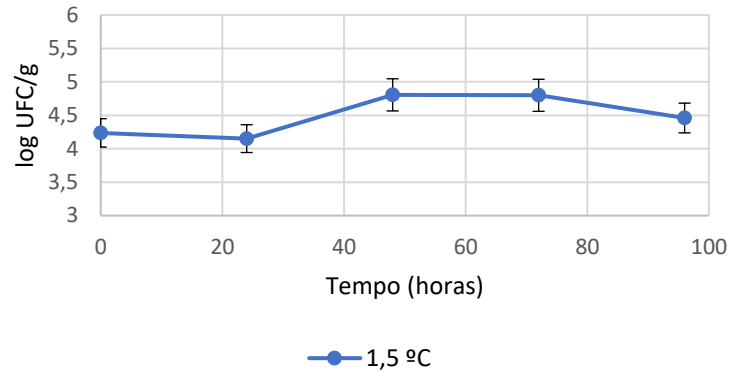


Gráfico 34. Crescimento de *L. monocytogenes* em Pescado ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 8 para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 °C. $\delta (1,5^\circ\text{C}) = 0,567783$;

Gráfico 35. Crescimento de *L. monocytogenes* em Pescado ao longo de um período de 96 horas (consultar tabela 1 pertencente ao anexo 8, para consulta dos valores referentes a temperatura de descongelação 1,5 °C. $\delta (1,5^\circ\text{C}) = 0,273833$;

Tabela 4. Comportamento de *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes* ao longo do processo de descongelação a temperatura de refrigeração (1,5 e 4 °C) durante 96 horas em diversos alimentos. (Nota: simboliza descida e subida das contagens populacionais da bactéria.

Alimentos	Microrganismos								
	1,5 °C	<i>S. aureus</i>	4 °C	1,5 °C	<i>E. coli</i>	4 °C	1,5 °C	<i>L. monocytogenes</i>	4 °C
Peru	Manutenção ↔ (até 96 horas)	Manutenção ↔ (até 96 horas)	↑ 0,5 log UFC/g (até 24 horas)	↓ 0,3 log UFC/g (até 48 horas)	↑ 0,5 log UFC/g (até 96 horas)	↑ 1,3 log UFC/g (até 96 horas)			
			↓ 0,1 log UFC/g (até 96 horas)	↑ 0,4 log UFC/g (até 96 horas)					
Frango	↑ 0,1 log UFC/g (até 24 horas)	↓ 0,2 log UFC/g (até 48 horas)	↑ 0,6 log UFC/g (até 96 horas)	↓ 0,8 log UFC/g (até 48 horas)	↑ 1 log UFC/g (até 96 horas)	↑ 0,5 log UFC/g (até 96 horas)			
	↓ 0,3 log UFC/g (até 48 horas)	↑ 0,2 log UFC/g (até 96 horas)		↑ 0,5 log UFC/g (até 96 horas)					

	<p>↑ 0,1 log UFC/g (até 72 horas)</p> <p>↓ 0,3 log UFC/g (até 96 horas)</p>					
Carne Vermelha	<p>↓ 0,3 log UFC/g (até 96 horas)</p>	<p>↓ 0,2 log UFC/g (até 96 horas)</p>	<p>↓ 0,4 log UFC/g (até 24 horas)</p> <p>↑ 0,5 log UFC/g (até 48 horas)</p> <p>↑ 0,2 log UFC/g (até 96 horas)</p>	<p>↓ 0,3 log UFC/g (até 96 horas)</p>	<p>Manutenção ↔ (até 96 horas)</p>	<p>↑ 0,5 log UFC/g (até 96 horas)</p>
Mistura de vegetais	<p>↓ 0,5 log UFC/g (até 72 horas)</p> <p>↑ 0,4 log UFC/g (até 96 horas)</p>	<p>↑ 0,3 log UFC/g (até 24 horas)</p> <p>↓ 0,7 log UFC/g (até 48 horas)</p> <p>↑ 0,2 log UFC/g (até 96 horas)</p> <p>↓ 0,1 log UFC/g</p>	<p>Manutenção ↔ (até 96 horas)</p>	<p>↓ 1,1 log UFC/g (até 72 horas)</p> <p>Manutenção ↔ (até 96 horas)</p>	<p>Manutenção ↔ (até 72 horas variações na ordem dos 0,1 log UFC/g)</p> <p>↑ 1,5 log UFC/g (até 96 horas)</p>	<p>Manutenção ↔ (até 48 horas)</p> <p>↑ 1,3 log UFC/g (até 96 horas)</p>

		(até 48 horas)				
Batatas	Manutenção ↔ (até 96 horas)	Manutenção ↔ (até 96 horas)	↓ 0,3 log UFC/g (até 48 horas) ↑ 0,2 log UFC/g (até 72 horas) ↓ 0,2 log UFC/g (até 96 horas)	Manutenção ↔ (até 72 horas) ↑ 0,8 log UFC/g (até 96 horas)	↓ 0,3 log UFC/g (até 48 horas) ↑ 0,4 log UFC/g (até 96 horas)	Manutenção ↔ (até 72 horas) ↑ 0,1 log UFC/g (até 96 horas)
Cogumelos	Manutenção ↔ (até 48 horas) ↓ 0,3 log UFC/g (até 72 horas) ↑ 0,1 log UFC/g (até 96 horas)	↑ 0,6 log UFC/g (até 96 horas)	↓ 1,8 log UFC/g (até 96 horas)	↓ 3,3 log UFC/g (até 96 horas)	↓ 0,4 log UFC/g (até 96 horas)	↑ 0,3 log UFC/g (até 96 horas)
Camarão	↓ 0,2 log UFC/g (até 72 horas) ↑ 0,6 log UFC/g (até 96 horas)	↑ 0,4 log UFC/g (até 96 horas)	↓ 1 log UFC/g (até 96 horas)	↓ 0,4 log UFC/g (até 48 horas) ↑ 0,2 log UFC/g (até 96 horas)	Manutenção ↔ (até 48 horas) ↑ 1,6 log UFC/g	Manutenção ↔ (até 48 horas) ↑ 2,2 log UFC/g

Lulas	<p>↓ 0,3 log UFC/g (até 24 horas)</p> <p>↑ 0,7 log UFC/g (até 96 horas)</p>	----	<p>↓ 0,3 log UFC/g (até 72 horas)</p> <p>↑ 0,2 log UFC/g (até 96 horas)</p>	<p>↓ 0,3 log UFC/g (até 48 horas)</p> <p>↑ 0,3 log UFC/g (até 96 horas)</p>	<p>Manutenção ↔ (até 48 horas)</p> <p>↑ 1,8 log UFC/g (até 96 horas)</p>	<p>Manutenção ↔ (até 48 horas)</p> <p>↑ 0,5 log UFC/g (até 96 horas)</p>
Pescado 1	----	----	----	----	<p>↑ 1,5 log UFC/g (até 96 horas)</p>	----
Pescado 2	----	----	----	----	<p>↑ 0,5 log UFC/g (até 48 horas)</p> <p>↓ 0,3 log UFC/g (até 96 horas)</p>	----

Os valores de contagens de *S. aureus*, em ambos os ensaios efetuados apresentaram alterações entre 0,1 e 0,3 log UFC/g. A estabilidade da densidade bacteriana é bastante relevante na questão do transporte de alimentos congelados para análise microbiológica, sob condições de refrigeração.

O comportamento de *E. coli* nos alimentos testados foi bastante variável, podendo em algumas situações apresentar um decréscimo e outras um aumento. As alterações foram de 0,1 a 3 log UFC/g, mas na grande maioria dos casos estes não ultrapassaram o valor de 1 log UFC/g. Assim sendo, neste caso específico a diminuição do período poderá ter efeitos positivos no controlo da variação da densidade desta espécie. É necessário ter em conta que as células de *E. coli* podem sofrer danos provocados pelo frio que depois poderão

afetar a capacidade de detecção/quantificação da mesma em meios de cultura (Hara-Kudo et al, 2000). Hara-Kudo et al (2000) demonstraram que células de *E. coli* O157:H7 são danificadas pelo armazenamento por congelação e que este fenómeno irá depender da matriz alimentar em que a estirpe se encontra (Hara-Kudo et al, 2000). Os autores do estudo demonstraram que carne vermelha não provoca danos nas células, o que facilita a sua detecção, enquanto que, por exemplo, fruta tem esse efeito na bactéria, dificultando assim a sua detecção em meios de cultura (Hara-Kudo et al, 2000).

Não é possível estabelecer uma concordância do comportamento de *L. monocytogenes* entre os diferentes grupos de alimentos nas duas temperaturas testadas, no entanto, é possível afirmar que os produtos marinhos reúnem condições propícias para a proliferação desta bactéria. Para a maioria dos produtos analisados ocorreu um aumento superior a 0,5 log UFC/g nas contagens microbianas após 72 horas.

Tal como referido anteriormente, *S. typhimurium* foi somente avaliada quanto à sua presença, tendo sido possível detetá-la em qualquer um dos alimentos, nas condições de descongelação a 1,5 e a 4 °C, durante um período de 96 horas com uma periodicidade de 24 horas. Este fenómeno seria já espectável, uma vez que a detecção desta bactéria resulta de um tratamento de enriquecimento e, portanto, desde que o número de células não seja extremamente baixo, existe facilidade em detetar a sua presença, tal como foi observável no primeiro ensaio. A presença de *S. typhimurium* foi detetada em todas as amostras alimentares contaminadas com esta estirpe: peru; frango; mistura de vegetais; cogumelos; lulas; carne vermelha; camarão e batatas. Os resultados obtidos encontram-se de acordo com outros estudos, nomeadamente de Dorsa et al (1998), que reportaram que *S. typhimurium* quando inoculado em carne vermelha armazenada durante 14 dias a 4 °C se mantinha constante (Dorsa et al, 1998). Este comportamento mostra que *S. typhimurium* não possui capacidade de crescer nestas condições de temperatura no alimento, embora consiga sobreviver (Dorsa et al, 1998). Liu et al (2016), observaram uma diminuição gradual em populações de *Salmonella* inoculadas em amostras de atum armazenadas a 5-7 °C durante 14 dias (Liu et al, 2016). Este estudo mostra uma diminuição contínua da bactéria, o que pode ter ocorrido no presente estudo, mas como o procedimento aqui utilizado foi a detecção não foi possível determinar se ocorreu diminuição nas contagens (Liu et al, 2016).

Em suma, foi observada diferença estatística no comportamento bacteriano quando submetidas às duas temperaturas de refrigeração (1,5 e 4 °C), em diversas amostras alimentares e para diferentes microrganismos. No entanto, não foi possível concluir que um dos valores de temperatura utilizado seja mais apropriado, uma vez que o comportamento depende do alimento e do microrganismo inoculado no mesmo. Por outro lado, se o período de análise for ajustado, para 24 ou 48 horas, é possível definir condições que permitam que ao longo do processo de descongelação de alimentos que os teores bacterianos não se alterem significativamente. Para confirmar estes resultados são necessários mais ensaios.

Conclusão

O presente estudo não permitiu encontrar uma resposta conclusiva na definição de um valor de temperatura superior a (-18 °C) que possibilitasse o transporte de alimentos congelados no trajeto cliente-empresa garantindo, assim, que as contagens bacterianas dos mesmos não se alterassem significativamente, durante um determinado período.

O comportamento bacteriano é variável consoante o alimento e a espécie estudada, pelo que definir um período e uma temperatura de transporte que seja viável para todas as situações é algo complexo. No entanto, é consensual no presente estudo que uma temperatura de 1,5 ou 4 °C durante 24 horas, confere na grande maioria dos produtos alimentares que a sua densidade bacteriana não se altere significativamente. Deste modo, o trabalho prático que proponho para a futura conclusão deste projeto será submeter os géneros alimentares aqui descritos a contaminação individual com as seguintes bactérias: *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *C. clostridium*, *C. botulinum*, *C. jejuni*, *Shigella*, *V. cholerae*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophila*. De seguida, as amostras deverão ser submetidas a congelação a -18 °C durante um período de 7 dias. O procedimento de análise microbiológica consistirá em submeter os mesmos produtos a descongelação a 1,5 e/ou 4 °C durante 48 horas, analisando-os com a periodicidade de 2 horas. Os procedimentos utilizados deverão ser iguais aos aqui descritos. Assim sendo, será possível definir um valor de temperatura e um determinado período que confira segurança microbiológica no trajeto cliente-empresa de alimentos congelados.

Referência bibliográficas

- Abdellrazeq, G., Kamar, A., & El-Houshy, S., (2014). Molecular characterization of *Listeria* species isolated from frozen fish. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 40:1-15.
- Alsheikh, A., Mohammed, G., Abdalla, M., & Bakhiet, A. (2014). First Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* Isolated from Frozen and Shock Frozen Dressed Broiler Chicken in Sudan. *Sciencedomain International* 4(1), 28–38.
- Altekruse, S., Stern, N., Fields, P., & Swerdlow, D. (1999). *Campylobacter jejuni* — an emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 5(1), 28–35.
- Anang, D., Rusul, G., Bakar, J. & Ling, F. H. (2007). Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored at 4 ° C. *ScienceDirect*, 18, 961–969.
- Archer, D. (2004). Freezing: an underutilized food safety technology?. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 127–138.
- Arnesen, L., Fagerlund, A., & Granum, P. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 579-606.
- Baka, M., Verheyen, D., Cornette, N., Vercruyssen, S., & Impe, J. (2016). *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* dynamics in/on variable (micro) structures of fish-based model systems at suboptimal temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 240, 32-39. (a)
- Baka, M., Vercruyssen, S., Cornette, N., & Impe, J. (2016). Dynamics of *Listeria monocytogenes* at suboptimal temperatures in/on fish-protein based model systems: Effect of (micro) structure and microbial distribution. *Food Control*, XXX, 1-8. (b)
- Barkocy-gallagher, G., Kang, D. & Koochmaraie, M. (2002). Fate of Field-Isolated *Escherichia coli* O157 in ground beef at different storage temperatures. *Journal of Food Protection*, 65(7), 1106–1109.
- Bavaro, M. (2012). *E. coli* O157: H7 and other toxigenic strains: the curse of global food distribution. *Curr Gastroenterol Reports*, 317–323.
- Baumgardner, D. (2012). Soil-Related Bacterial and Fungal Infections. *JABFM*, 25(5), 734–744.
- Bhunja A. (2018) Introduction to Foodborne Pathogens. In: Foodborne Microbial Pathogens. *Food Science Text Series*. 1-23
- Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiol.* 3(3): 529–563.
- Brackett, R. & Beauchat, L. (1990) Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* Grown on Crabmeat. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (5), 1216-1220.
- Brynstad, S., & Granum, P. (2002). *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 195–202.
- Catford, A., Ganz, K., & Tamber, S. (2017). Enumerative analysis of *Salmonella* in outbreak-associated breaded and frozen comminuted raw chicken products. *Journal of Food Protection*, 80(5), 814–818.

- Dack., G. & Lippitz, G. (1962). Fate of Staphylococci and enteric microorganisms introduced into slurry of frozen pot pies, *Applied Microbiology*, 10 (5), 472-479.
- Dorsa, W., Cutter, C., & Siragusa, G. (1998). Bacterial profile of ground beef made from carcass tissue experimentally contaminated with pathogenic and spoilage bacteria before being washed with hot water, alkaline solution, or organic acid and then stored at 4 or 12 °C. *Journal of Food Protection* 61(9), 1109–1118.
- Elbashir, S., Parveen, S., Schwarz, J., Rippen, T., Jahncke, M., & Depaola, A. (2018). Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A review. *Food Microbiology*, 70, 85–93.
- El-kest, S. E., & Marth, E. H. (1992). Freezing of *Listeria monocytogenes* and Other Microorganisms: A Review. *Journal of Food Protection*, 55(8), 639–648.
- Eng, S., Pusparajah, P., Mutalib, N., Ser, H., Chan, K., & Lee, L. (2015). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology, and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284-293.
- Englezos, S., Huang, B., Dykes, G., Fegan, N. (2010). The prevalence and concentration of *Bacillus cereus* in retail food products in brisbane. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(7), 2–5.
- Fetsch, A., & Jöhler, S. (2018). *Staphylococcus aureus* as a foodborne pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5, 88–96.
- Food, E., & Authority, S. (2018). Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6, infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables. *European Food Safety Authority*, 15(7), 1448.
- Geiges, O. (1996) Microbial processes in frozen food. *Elsevier Science*, 18 (12), 109-118.
- Gill, A. & Huszczynski, G., (2016). Enumeration of *Escherichia coli* O157: H7 in outbreak-associated beef patties. *Journal of Food Protection*, 79(7), 1266–1268.
- Golden, D. A., & Arroyo-gallyoun, L. (1997). Relationship of frozen-food quality to microbial survival. In: Erickson M.C., Hung YC. (eds) *Quality in frozen food*. Springer, Boston, MA.
- Hao, D., Xing, X., Li, G., Wang, X., Zhang, M., Zhang, W. & Meng, J. (2015). Prevalence, toxin gene profiles, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from quick-frozen dumplings. *Journal of Food Protection*, 78(1), 218–223.
- Hara-Kudo, Y., Ikedo, M., Kodaka, H., Nakagawa, H., Goto, K., Masuda, T., Konuma, H., Kojima, T., & Kumagai, S. (2000). Selective enrichment with a resuscitation step for isolation of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2866–2872.
- Hassan, R., Tecele, S., Adcock, B., Kellis, M., Weiss, J., Saupe, A., Sorenson, A., Klos, R., Blankenship, J., Blessington, T., Whitlock, L., Carleton, H., Concepción-Acevedo, J., Tolar, B., Wise, M., & Neil, K. P. (2019). Multistate outbreak of *Salmonella paratyphi* B variant L (+) tartrate (+) and *Salmonella weltevreden* infections linked to imported frozen raw tuna: USA, March – July 2015. *Epidemiology and Infection*, 146,1461–1467.

- Haute, S. Van, Raes, K., Meeren, P. Van Der, & Sampers, I. (2016). The Effect of cinnamon, oregano, and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. *Food Control*, 68, 30-39
- Hossain-Jany, N., Islam, R., Mazumder, A. R., & Uddin (2016). Design and application of hazard analysis critical control point principles for typical frozen vegetables. *Journal of Food Safety and Hygiene*, 2, 1-2.
- Humphrey, T., O'Brien, S., & Madsen, M. (2007). Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 237–257.
- Ingham, S., Wadhwa, R., Fanslau, M., & Buege, D. (2005). Growth of *Salmonella* Serovars, *Escherichia coli* O157:H7, and *Staphylococcus aureus* during thawing of whole chicken and retail ground beef portions at 22 and 30 °C. *Journal of Food Protection*, 68(7), 1457–1461.
- Islam, M., Hasan, M., & Khan, S. (1993). Growth and survival of *Shigella flexneri* in common bangladesh food under various conditions of time and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (2), 652–654.
- Jang, J., Hur, H., Sadowsky, M., Byappanahalli, M., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications. *Journal of Applied microbiology*, 123(3), 570-581
- Johnson, N., Chang, Z., Almeida, C. B., Michel, M., Iversen, C., & Callanan, M. (2014). Evaluation of indirect impedance for measuring microbial growth in complex food matrices. *Food Microbiology*, 42, 8–13
- Junttila, J. R., Niemelas, S. I., & Hirn, J. (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria. *Journal of Applied Bacteriology*, 65(4) 321-327
- Kataoka, A., Wang, H., Elliott, P., Whiting, R. C., & Hayman, M. M. (2017). Growth of *Listeria monocytogenes* in thawed frozen foods. *Journal of Food Protection* 80(3), 447–453.
- Kereluk, K., Peterson, A., & Gunderson, M. (1960). Effect of different isolated temperatures from frozen on various meat pies. *Journal of Food Science*, 26 (1), 21-25.
- Labbé, R., & Juneja, V. (2017). Clostridium Perfringens Gastroenteritis. Foodborne Infections and Intoxications. Chapter 6. Elsevier Inc., Foodborne and Intoxications.
- Lianou, A., & Koutsoumanis, K. (2009). Evaluation of the effect of defrosting practices of ground beef on the heat tolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *Meat Science*, 82(4), 461–468.
- Liu, C., Mou, J., & Su, Y. (2016). Behavior of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw yellowfin tuna during cold storage. *Food*, 5(1), 16
- Loir, Y., Baron, F. & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2 (1): 7-28
- Machado-Moreira, B., Richards, K., Brennan, F., Abram, F., & Burgess, C. M. (2019). Microbial contamination of fresh produce: what, where, and how?. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 18(6), 1727-1750
- McNeil, C., Sisson, W., & Jarrett, A. (2017). Listeriosis: A resurfacing menace. *The Journal for Nurse Practitioners*, 13(10), 647–654.

- Messelhauser, U., Kampf, P., Fricker, M., Ehling-Schulz, M., Zucker, R., Wagner, B., Busch, U., Holler, C. (2010). Prevalence of emetic *Bacillus cereus* in different ice creams in bavaria. *Journal of Food Protection*, 73(2), 395–399.
- Mughini-gras, L., Schaapveld, M., Kramers, J., Mooij, S., Neefjes-borst, A., Pelt, W. Van, & Neefjes, J. (2018). Increased colon cancer risk after severe *Salmonella* infection. *PLOS ONE* 1–19.
- Nabil, E., El, A., Amer, I., Elsayed, M., Mansour, A., & University, Z. (2015). Assessment of the effect of freezing on the survival of some pathogen bacteria in ice cream. *Journal of Global Biosciences*, 4(7), 2873–2877.
- Nyhan, L., Begley, M., Mutel, A., Qu, Y., Johnson, N., & Callanan, M. (2018). Predicting the combinatorial effects of water activity, pH, and organic acids on *Listeria* growth in media and complex food matrices. *Food Microbiology*, 74, 75-85
- Novoslavskij, A., Terentjeva, M., Eizenberga, I., Valcina, O., Bartkevi, V., & Aivars, B. (2015). Major foodborne pathogens in fish and fish products: a review. *Annals of Microbiology*, 66, 1-15.
- Omer, M., Álvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., Skjerve, E., Asehun, T., Alvseike, O. A., (2018). A Systematic Review of Bacterial Foodborne Outbreaks Related to Red Meat and Meat Products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15 (10) 598-611.
- Raccach, M., Johnson, J., Tielbur, G., Greshell, D. & Holt, J. (2008) The fate the fecal coliform *Escherichia coli*, in baby foods stored frozen. *Journal of Food Technology*, 6(2), 80-85
- Roberts, T., (2018). Food Safety Economics, *Food Microbiology and Food Safety*.
- Sage, J., & Ingham, S. (1998). Survival of *Escherichia coli* 0157: H7 after freezing and thawing in ground beef patties. *Journal of Food Protection*, 61(9), 1181–1183.
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1–12.
- Speck, M., & Ray, B. (1977). Effects of freezing and storage on microorganisms in frozen foods: A Review. *Journal of Food Protection*, 40(5), 333–336.
- Peck, M. (2006) *Clostridium botulinum* and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue?. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 556-570.
- Pinton, S., Bardsley, C., Marik, C., Boyer, R., & Strawn, L., (2020). Fate of *Listeria monocytogenes* on broccoli and cauliflower under different storage temperatures. *Journal of Food Protection*, 83 (5): 858–864.
- Sobel, J. (2005). Botulism. *Clinical Infectious Diseases*, 41, 1167–1173.
- Taylor, P., Chan, Y., Wiedmann, M., Chan, Y., & Wiedmann, M. (2008). Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 49 (3) 37–41
- Rouger, A., Tresse, O., & Zagorec, M., (2017). Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. *Microorganisms*, 5(3), 50.

Valdramidis, V. (2016), Modeling in Food Microbiology, Capítulo 1, Elsevier.

Viazis, S., & Diez-gonzalez, F. (2011). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: The twentieth century's emerging foodborne pathogen: A Review. *Advances in Agronomy*, 111, 1-50.

Weerakkody, N., Caffin, N., & Dykes, G. (2011). Effect of antimicrobial spice and herb extract combinations on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and spoilage microflora growth on cooked ready-to-eat vacuum-packaged shrimp. *Journal of Food Protection*, 74(7), 1119–1125.

Wilson, P., Brocklehurst, T., Arino, S., Thuault, D., & Jakobsen, M., Farkas, J., Wimpenny, J., & Van Impe, J. (2002). Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 275–289.

Zilelidou, E., & Skandamis, P. (2018). International journal of food microbiology growth, detection, and virulence of *Listeria monocytogenes* in the presence of other microorganisms: microbial interactions from species to strain level. *International Journal of Food Microbiology*, 27(7), 10–25.

Anexo 1

Tabela 1. Valores logarítmicos de desenvolvimento de *E. coli* em alimentos (A. Peru; C. Vegetais; E. Couve-bruxelas; F. Cogumelos; G. Frango; H. Marisco; I. Lulas; K. Carne vermelha) a temperatura ambiente (18-25 °C), durante 9 horas, referentes ao gráfico 1, valores log UFC/g.

Período (em horas)	Log A	Log C	Log E	Log F	Log G	Log H	Log I	Log K
1	3,889302	4,051795	3,778151	3,647057	3,901277	4,094587	2,79005	3,808436
3	3,78533	4,149219	3,619789	3,662758	3,919078	4,032081	2,865301	3,960312
5	3,667453	4,224447	3,60206	3,871184	3,853292	3,739572	2,845098	3,787697
7	3,64836	4,627707	3,704722	3,832509	3,882714	3,832509	2,823909	3,794720
9	3,921686	4,524612	3,361728	3,832509	4,022566	4,010017	2,954243	3,790050

Tabela 2. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Peru (A) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18-25 °C), expressos em UFC/g. Nota: A réplica A não foi considerada, devido a falta de valores.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média (4A)
1	-	6500	9000	7750
3	8700	6100	6100	6100
5	-	3000	6300	4650
7	-	4200	4700	4450
9	-	11200	5500	8350

Tabela 3. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Mistura de vegetais – pimento vermelho, cebola, milho, feijão-verde (C) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média
1	10900	12100	10800	11266,67
3	19900	11000	11400	14100
5	22800	12500	15000	16766,67
7	52000	13300	62000	42433,33
9	52000	21900	26500	33466,67

Tabela 4. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Couve-bruxelas (E) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média
---------	-----------	-----------	-----------	-------

1	11900	4600	1500	6000
3	1400	3600	7500	4166,667
5	4400	2900	4700	4000
7	2100	6200	6900	5066,667
9	1500	1400	4000	2300

Tabela 5. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Cogumelos (F) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média
1	2350	9900	1060	4436,667
3	5600	1300	6900	4600
5	8000	8100	6200	7433,333
7	6400	8000	6000	6800
9	6100	7600	6700	6800

Tabela 6. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Frango (G) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média
1	10800	7300	5800	7966,667
3	14500	9000	1400	8300
5	8000	6000	7400	7133,333
7	12100	3400	7400	7633,333
9	23400	6900	1300	10533,33

Tabela 7. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Marisco (H) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Tempo	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média
1	23800	8800	4700	12433,33
3	29300	1930	1070	10766,67
5	13100	2200	1170	5490
7	16000	2000	2400	6800
9	19300	3400	8000	10233,33

Tabela 8. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Lulas (I) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média
---------	-----------	-----------	-----------	-------

1	650	400	800	616,6667
3	100	1600	500	733,3333
5	200	1300	600	700
7	700	900	400	666,6667
9	1100	700	900	900

Tabela 9. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Carne vermelha (K) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média K
1	5700	800	12800	6433,333
3	8500	1480	17400	9126,667
5	17800	300	300	6133,333
7	2300	7400	9000	6233,333
9	8400	1000	9100	6166,667

Anexo 2

Tabela 1. Valores logarítmicos de desenvolvimento de *L. monocytogenes* em alimentos (A. Peru; B. Frango; C. Vegetais; K. Carne vermelha; F. Cogumelos; D. Salmão) a temperatura ambiente (18-25 °C), durante 9 horas, referentes ao gráfico 2, valores log UFC/g.

Período (em horas)	Log A	Log B	Log C	Log K	Log F	Log D
1	4,370451	4,157356	4,151268	4,398172	2,970037	4,518514
3	4,377185	4,453318	4,274158	4,530541	3,113943	4,30103
5	4,323596	4,772566	4,619789	4,721261	3,30103	4,221849
7	4,274158	4,803912	4,64673	4,894685	3,425969	4,335792
9	5,220979	4,915048	4,516756	4,927370	3,665894	4,30103

Tabela 2. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Peru (A) durante 9 horas, a temperatura ambiente (20 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 4A
1	11400	25000	34000	23466,67
3	33000	14400	24100	23833,33
5	32000	20600	10600	21066,67
7	21800	20000	14600	18800
9	176000	143000	180000	166333,3

Tabela 3. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Frango (B), a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 4B
1	19000	13100	11000	14366,67
3	29000	26200	30000	28400
5	69000	50000	58700	59233,33
7	67000	68000	62000	63666,67
9	74700	72000	100000	82233,33

Tabela 4. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Mistura de vegetais – pimento vermelho, cebola, milho, feijão-verde (C) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 4C
1	14000	11000	17500	14166,67
3	19700	18700	18000	18800
5	41000	38000	46000	41666,67
7	64000	38000	31000	44333,33
9	20600	49000	29000	32866,67

Tabela 5. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Carne vermelha (K) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 4K
1	14300	49900	10840	25013,33
3	10520	80300	10960	33926,67
5	15000	94800	48100	52633,33
7	66200	99900	69300	78466,67
9	78200	96700	78900	84600

Tabela 6. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Cogumelos (F) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 4F
---------	-----------	-----------	-----------	----------

1	1000	1300	500	933,3333
3	1300	1300	1300	1300
5	700	1700	3600	2000
7	4000	3000	1000	2666,667
9	3000	2900	8000	4633,333

Tabela 7. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Salmão (D) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 4D
1	40000	29000	30000	33000
3	30000	10000	20000	20000
5	30000	10000	10000	16666,67
7	30000	15000	20000	21666,67
9	20000	30000	10000	20000

Anexo 3

Tabela 1. Valores logarítmicos de desenvolvimento de *S. aureus* em alimentos (A. Peru; B. Frango; C. Vegetais; D. Salmão; E. Couve-bruxelas; F. Cogumelos; H. Marisco; I. Lulas) a temperatura ambiente (18-25 °C), durante 9 horas, referentes ao gráfico 1, valores log UFC/g.

Período (em horas)	Log A	Log B	Log C	Log D	Log E	Log F	Log H	Log I
1	4,339788	3,983025	3,054358	3,202307	3,812913	3,878905	4,133539	3,59769519
3	4,200486	3,906694	3,156347	3,286307	3,575957	3,735066	4,184691	3,5171959
5	4,19774	3,963788	3,176091	3,221849	3,770852	3,840942	4,100371	3,55790803
7	4,085172	4,049218	3,213075	3,467361	3,544068	3,803912	4,121669	3,71655977
9	4,044017	4,171239	3,221849	3,50965	3,572097	3,913814	4,068186	3,79657433

Tabela 2. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Peru (A) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C) expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 4A
1	29900	28200	7500	21866,67

3	23400	20200	4000	15866,67
5	17500	26700	3100	15766,67
7	12800	20900	2800	12166,67
9	15000	11500	6700	11066,67

Tabela 3. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Frango (B), a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 4B
1	1650	1700	25500	9616,667
3	7800	3600	12800	8066,667
5	4000	11300	12300	9200
7	10800	10900	11900	11200
9	18000	12700	13800	14833,33

Tabela 4. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Mistura de vegetais – pimento vermelho, cebola, milho, feijão-verde (C) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 4C
1	1700	300	1400	1133,333
3	1900	1500	900	1433,333
5	2100	1000	1400	1500
7	2000	1400	1500	1633,333
9	2000	2000	1000	1666,667

Tabela 5. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Salmão (D) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 4D
1	1070	2700	1010	1593,333
3	2300	1500	2000	1933,333
5	1800	1400	1800	1666,667
7	3700	1500	3600	2933,333

9	5200	1300	3200	3233,333
---	------	------	------	----------

Tabela 6. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Couve-bruxelas (E) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 4E
1	5300	6900	7300	6500
3	2000	4800	4500	3766,667
5	3500	9000	5200	5900
7	1300	3600	5600	3500
9	1700	3700	5800	3733,333

Tabela 7. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Cogumelos (F) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 4F
1	8500	5700	8500	7566,667
3	7900	3900	4500	5433,333
5	7000	6800	7000	6933,333
7	6800	4300	8000	6366,667
9	10600	8100	5900	8200

Tabela 8. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Marisco (H) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 4H
1	20000	10100	10700	13600
3	18300	7500	20100	15300
5	11600	10300	15900	12600
7	24600	6500	8600	13233,33
9	19800	9900	5400	11700

Tabela 9. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Lulas (I) durante 9 horas, a temperatura ambiente (18 – 25 °C), expressos em UFC/g.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 4I
1	6700	3900	1280	3960
3	2670	3300	3900	3290
5	1440	5200	4200	3613,333
7	1660	6600	7300	5206,667
9	4280	6800	7700	6260

Anexo 4

Tabela 1. Valores logarítmicos de desenvolvimento *S. aureus* em alimentos (A. Peru; B. Frango; C. Vegetais; E. Cogumelos; G. Lulas; H. Carne vermelha; I. Camarão; L. Batatas;) a temperatura de refrigeração (1,5 °C +/- 0,5), durante 96 horas, referentes ao gráfico 4, valores log UFC/g.

Período (em horas)	Log A	Log B	Log C	Log E	Log G	Log I	Log H	Log L
0	4,032081	4,520702	4,501059	3,992701	3,689901	4,258478	4,081587	3,587337
24	4,010017	4,603866	4,468839	4	3,39794	4,101518	4,144055	3,514105
48	4,194052	4,329059	4,152288	3,986772	3,636822	4,09108	4,161368	3,572097
72	3,931119	4,457377	4,028029	3,687232	3,755875	4,144055	3,971585	3,678215
96	4,09922	4,176091	4,447158	3,803912	4,94118	4,726999	3,69314	3,496007

Tabela 2. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Peru (A) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +/-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 9A
0	8900	10900	12500	10766,67
24	10100	12900	7700	10233,33
48	18600	11000	17300	15633,33
72	8900	8600	8100	8533,333
96	15300	9700	12700	12566,67

Tabela 3. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Frango (B) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +/-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 9B
0	33800	35000	30700	33166,67
24	36000	37900	46600	40166,67

48	26000	17000	21000	21333,33
72	32000	31000	23000	28666,67
96	18000	11000	16000	15000

Tabela 4. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Vegetais (C) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C ±0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 9C
0	65900	13000	16200	31700
24	33900	24800	29600	29433,33
48	12800	12200	17600	14200
72	18000	8000	6000	10666,67
96	17000	18000	49000	28000

Tabela 5. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Cogumelos (E) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C ±0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 9E
0	6300	10900	12300	9833,333
24	9400	11300	9300	10000
48	12700	9200	7200	9700
72	3600	5100	5900	4866,667
96	5100	7500	6500	6366,667

Tabela 6. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Lulas (G) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C ±0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 9G
0	5400	1090	8200	4896,667
24	2000	1500	4000	2500
48	4100	4200	4700	4333,333
72	8900	4800	3400	5700
96	83000	92000	87000	87333,33

Tabela 7. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Carne vermelha (H) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 9H
0	12000	10400	13800	12066,67
24	13800	15600	12400	13933,33
48	14500	16000	13000	14500
72	11100	7200	9800	9366,667
96	5500	5100	4200	4933,333

Tabela 8. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Camarão (I) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 9I
0	28100	12400	13900	18133,33
24	27000	4000	6900	12633,333
48	14000	10000	13000	12333,333
72	14700	14000	13100	13933,333
96	82000	43000	35000	53333,33

Tabela 9. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Batatas (L) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 9L
0	3400	4000	4200	3866,667
24	3400	2200	4200	3266,667
48	3400	3600	4200	3733,333
72	6200	4300	3800	4766,667
96	3600	3400	2400	3133,333

Anexo 5

Tabela 1. Valores logarítmicos de desenvolvimento *S. aureus* em alimentos (A. Peru; B. Frango; C. Vegetais; E. Cogumelos; H. Carne vermelha; I. Camarão; L. Batatas;) a temperatura de refrigeração (4,0 °C +- 0,5), durante 96 horas, referentes ao gráfico 4, valores log UFC/g.

Período (em horas)	Log A	Log B	Log C	Log E	Log I	Log H	Log L
0	3,897627	4,171239	4,40025	3,166331	3,716003	4,075547	3,64673
24	3,977724	4,038753	4,737723	3,31527	3,6163	4,214844	3,544068
48	4,102662	3,991226	4,087545	3,669007	3,792392	4,132473	3,564271
72	3,919078	4,001445	4,25042	3,678215	4,199572	3,821732	3,575957
96	3,80618	4,227029	4,138829	3,70757	4,171239	3,845098	3,623249

Tabela 2. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Peru (A) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 6A
0	8800	8500	6400	7900
24	12200	7500	8800	9500
48	9400	14500	14100	12666,67
72	6800	7700	10400	8300
96	10300	7800	6400	8166,667

Tabela 3. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Frango (B) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 6B
0	9900	16700	17900	14833,33
24	12800	9700	10300	10933,33
48	7000	10000	12400	9800
72	9300	12800	8000	10033,33
96	11600	19700	19300	16866,67

Tabela 4. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Vegetais (C) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 6C
0	40600	18200	16600	25133,33
24	81000	43000	40000	54666,67
48	12000	15800	8900	12233,33
72	15200	18600	19600	17800

96	9800	11500	20000	13766,67
----	------	-------	-------	----------

Tabela 5. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Cogumelos (E) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4 °C +0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 6E
0	1200	1400	1800	1466,667
24	2500	2400	1300	2066,667
48	3000	7000	4000	4666,667
72	3050	7050	4200	4766,667
96	3600	7100	4600	5100

Tabela 6. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Carne vermelha (H) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4 °C +0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 6H
0	12400	10100	13200	11900
24	13000	22400	10400	16400
48	13300	15000	12400	13566,67
72	6800	6700	6400	6633,333
96	8800	5900	6300	7000

Tabela 7. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Camarão (I) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4 °C +0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 6I
0	4300	7400	3900	5200
24	6500	3700	2200	4133,333
48	5900	6000	6700	6200
72	23600	13500	10400	15833,33
96	14600	16900	13000	14833,33

Tabela 8. Valores obtidos para o desenvolvimento de *S. aureus* em Batatas (L) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4 °C +0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 6I
0	4700	6000	2600	4433,333
24	2200	4100	4200	3500
48	3000	4000	4000	3666,667
72	3200	3900	4200	3766,667
96	4300	5100	3200	4200

Anexo 6

Tabela 1. Valores logarítmicos de desenvolvimento *E. coli* em alimentos (A. Peru; B. Frango; C. Vegetais; E. Cogumelos; G. Lulas; H. Carne vermelha; I. Camarão; L. Batatas;) a temperatura de refrigeração (4,0 °C +- 0,5), durante 96 horas, referentes ao gráfico 6, valores log UFC/g.

Período (em horas)	Log A	Log B	Log C	Log E	Log G	Log I	Log H	Log L
0	4,285557	4,598791	4,644767	3,39794	3,818666	3,518514	4,139879	3,619789
24	4,232996	4,073107	4,335792	2,845098	3,954243	3,308137	3,840942	3,50965
48	3,912045	3,834633	3,932812	2,39794	3,636822	3,177055	3,681241	3,594761
72	4,213075	4,327699	3,522879	2,124939	3,924279	3,286307	3,78295	3,472269
96	4,31527	4,348954	3,552263	0	3,968483	3,335792	3,830375	4,24221

Tabela 2. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Peru (A) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4,0 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 7A
0	18900	25500	13500	19300
24	17800	20100	13400	17100
48	10000	5600	8900	8166,667
72	18300	12700	18000	16333,33
96	19000	37000	6000	20666,67

Tabela 3. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Frango (B) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4,0 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 7B
0	36500	45300	37300	39700

24	12700	10100	12700	11833,33
48	5600	5200	9700	6833,333
72	15600	21800	26400	21266,67
96	16100	23500	27400	22333,33

Tabela 4. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Vegetais (C) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4,0 °C ±0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 7C
0	94900	26000	11500	44133,33
24	24000	21000	20000	21666,67
48	8900	8800	8000	8566,667
72	3000	3000	4000	3333,333
96	1600	6800	2300	3566,667

Tabela 5. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Cogumelos (E) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4,0 °C ±0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 7E
0	1900	3800	1800	2500
24	100	1100	900	700
48	200	200	300	250
72	200	100	100	133,3333
96	0	0	0	0

Tabela 6. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Lulas (G) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4,0 °C ±0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 7G
0	1260	1300	17200	6586,667
24	7000	3000	17000	9000
48	6000	3000	4000	4333,333
72	8900	9100	7200	8400
96	9000	9900	9000	9300

Tabela 7. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Camarão (I) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4,0 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 7I
0	4200	300	5400	3300
24	2100	700	3299	2033
48	2300	1100	1110	1503,333
72	800	3700	1300	1933,333
96	2900	2200	1400	2166,667

Tabela 8. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Carne vermelha (H) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4,0 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 7H
0	16500	14500	10400	13800
24	7300	5300	8200	6933,333
48	5200	5200	4000	4800
72	6900	5800	5500	6066,667
96	7800	7000	5500	6766,667

Tabela 9. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Batatas (L) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4,0 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 7L
0	2200	6400	3900	4166,667
24	3900	4000	1800	3233,333
48	3000	4400	4400	3933,333
72	2000	3900	3000	2966,667
96	14400	20000	18000	17466,67

Anexo 7

Tabela 1. Valores logarítmicos de desenvolvimento *E. coli* em alimentos (A. Peru; B. Frango; C. Vegetais; E. Cogumelos; G. Lulas; H. Carne vermelha; I. Camarão; L. Batatas;) a temperatura de refrigeração (1,5 °C +- 0,5), durante 96 horas, referentes ao gráfico 7, valores log UFC/g.

Período (em horas)	Log A	Log B	Log C	Log E	Log G	Log I	Log H	Log L
0	3,486667	4,353467	3,79472	4,351539	4,168301	3,925999	4,547775	3,840942
24	3,920819	4,606381	3,671173	4,040075	4,054358	3,726999	4,185637	3,50965
48	3,834633	4,626682	3,79472	2,124939	4,038753	3,054358	4,60206	3,48192
72	3,721536	4,696065	3,681241	2,425969	3,755875	3,01424	4,552263	3,726999
96	3,859338	4,90309	3,704722	2,124939	3,946125	2,970037	4,753328	3,5272

Tabela 2. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Peru (A) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +/-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 10A
0	1800	3500	3900	3066,667
24	8700	8600	7700	8333,333
48	6900	6100	7500	6833,333
72	6600	5100	4100	5266,667
96	6400	7900	7400	7233,333

Tabela 3. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Frango (B) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +/-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 10B
0	14500	19200	34000	22566,67
24	46000	37900	37300	40400
48	25000	80000	22000	42333,33
72	43000	64000	42000	49666,67
96	48000	108000	84000	80000

Tabela 4. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Vegetais (C) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +/-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 10C
0	3300	5900	9500	6233,333
24	3690	4620	5760	4690
48	7200	8000	3500	6233,333

72	6000	1400	7000	4800
96	8000	3900	3300	5066,667

Tabela 5. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Cogumelos (E) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +/-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 10E
0	25900	19900	21600	22466,67
24	5900	16200	10800	10966,67
48	100	100	200	133,3333
72	100	100	600	266,6667
96	200	100	100	133,3333

Tabela 6. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Lulas (G) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +/-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 10G
0	18600	16900	8700	14733,33
24	20000	8000	6000	11333,333
48	16000	4000	12800	10933,33
72	5200	6200	6000	5700
96	7400	12600	6500	8833,333

Tabela 7. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Carne vermelha (H) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +/-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 10H
0	14200	55400	36300	35300
24	15400	11100	19500	15333,33
48	20000	70000	30000	40000
72	40000	37000	30000	35666,67
96	20000	70000	80000	56666,67

Tabela 8. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Camarão (I) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +/-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 10I
---------	-----------	-----------	-----------	-----------

0	9900	14100	1300	8433,333
24	6000	5000	5000	5333,333
48	1200	1200	1000	1133,333
72	600	1400	1100	1033,333
96	900	800	1100	933,3333

Tabela 9. Valores obtidos para o desenvolvimento de *E. coli* em Batatas (L) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 10L
0	9000	6200	5600	6933,333
24	2200	4200	3300	3233,333
48	3100	3700	2300	3033,333
72	3800	4200	8000	5333,333
96	2700	2600	4800	3366,667

Anexo 8

Tabela 1. Valores logarítmicos de desenvolvimento *L. monocytogenes* em alimentos (A. Peru; B. Frango; C. Vegetais; E. Cogumelos; G. Lulas; H. Carne vermelha; I. Camarão; J. Peixe; K. Peixe 2; L. Batatas;) a temperatura de refrigeração (1,5 °C +- 0,5), durante 96 horas, referentes ao gráfico 8, valores log UFC/g.

Período (em horas)	Log A	Log B	Log C	Log E	Log H	Log I	Log J	Log K	Log G	Log L
0	4,395618	4,675473	4,570932	4,857131	4,809784	4,499687	3,988262	4,237209	4,457882	4,285557
24	4,199572	4,839687	4,533179	4,717115	4,764674	4,484774	3,863323	4,151268	4,463893	4,042707
48	4,472269	5,085172	4,672098	4,443524	4,737987	4,605305	4,414973	4,805727	4,546543	4,023938
72	4,378398	5,222716	4,48192	4,504697	4,751279	5,162365	4,835479	4,799341	5,407674	4,20412
96	4,710681	5,71405	5,923934	4,432969	4,724276	6,213075	5,40824	4,459895	6,264818	4,429752

Tabela 2. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Peru (A) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 11A
0	17900	26900	29800	24866,67

24	16400	16700	14400	15833,33
48	23400	29700	35900	29666,67
72	22500	20200	29000	23900
96	48900	49300	55900	51366,67

Tabela 3. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Frango (B) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +/-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 11B
0	51200	47900	43000	47366,67
24	64800	65700	76900	69133,33
48	123000	96000	146000	121666,7
72	315000	86000	100000	167000
96	312000	557000	684000	517666,7

Tabela 4. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Vegetais (C) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +/-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 11C
0	38800	32000	40900	37233,33
24	34000	28700	39700	34133,33
48	67000	34000	40000	47000
72	52000	23000	16000	30333,33
96	999000	1050000	469000	839333,3

Tabela 5. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Cogumelos (E) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +/-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 11E
0	89500	91500	34900	71966,67
24	45800	48500	62100	52133,33
48	27600	25500	30200	27766,67
72	32300	35700	27900	31966,67
96	19700	38200	23400	27100

Tabela 6. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Carne vermelha (H) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 11H
0	71000	60800	61800	64533,33
24	58900	58100	57500	58166,67
48	51800	58700	53600	54700
72	57600	57900	53700	56400
96	61000	78000	20000	53000

Tabela 7. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Camarão (I) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 11I
0	26900	28200	39700	31600
24	32700	29400	29500	30533,33
48	47000	34900	39000	40300
72	197000	82000	157000	145333,3
96	1800000	1100000	2000000	1633333

Tabela 8. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Pescado (J) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 11J
0	6800	11200	11200	9733,333
24	3800	4600	13500	7300
48	24800	20400	32800	26000
72	63600	70500	71300	68466,67
96	243000	255000	270000	256000

Tabela 9. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Pescado (K) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 11K
0	21100	13700	17000	17266,67

24	12200	13200	17100	14166,67
48	65800	63000	63000	63933,33
72	63000	30000	96000	63000
96	39100	10200	37200	28833,33

Tabela 10. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Lulas (G) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +/-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 11K
0	18000	39400	28700	28700
24	29300	29100	28900	29100
48	54400	26600	24600	35200
72	484000	263000	20000	255666,7
96	1400000	2120000	2000000	1840000

Tabela 11. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Batatas (L) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +/-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 11L
0	19400	19500	19000	19300
24	12700	9300	11100	11033,33
48	9200	12000	10500	10566,67
72	17000	11400	19600	16000
96	24600	28000	28100	26900

Anexo 9

Tabela 1. Valores logarítmicos de desenvolvimento *L. monocytogenes* em alimentos (A. Peru; B. Frango; C. Vegetais; E. Cogumelos; G. Lulas; H. Carne vermelha; I. Camarão; L. Batatas;) a temperatura de refrigeração (4 °C +/- 0,5), durante 96 horas, referentes ao gráfico 8, valores log UFC/g.

Período (em horas)	Log A	Log B	Log C	Log E	Log G	Log H	Log I	Log L
0	4,599155	4,139879	4,80776	3,20412	4,158362	4,680033	4,649335	4,332438
24	4,682145	4,282547	4,476638	3,361728	4,205024	4,700415	4,62634	4,185637

48	4,756636	4,151268	4,364238	3,367977	4,162365	4,711526	5,238882	4,190332
72	4,966924	4,49369	4,71321	3,462398	4,507406	4,73132	5,780077	4,322908
96	5,804821	4,649984	5,678215	3,531479	4,446641	5,124939	5,899456	5,775732

Tabela 2. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Peru (A) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 8A
0	22400	44300	52500	39733,33
24	49300	47400	47600	48100
48	52300	76900	42100	57100
72	97000	79000	102000	92666,67
96	803000	489000	622000	638000

Tabela 3. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Frango (B) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 8B
0	11000	18400	12000	13800
24	21000	16400	20100	19166,67
48	12200	13200	17100	14166,67
72	27900	31100	34500	31166,67
96	63500	34500	36000	44666,67

Tabela 4. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Vegetais (C) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (1,5 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 8C
0	127000	37900	27800	64233,33
24	26400	30100	33400	29966,67
48	27700	25000	16700	23133,33
72	20000	46000	89000	51666,67
96	255000	497000	678000	476666,7

Tabela 5. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Cogumelos (E) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 8E
0	1000	1900	1900	1600
24	1900	2700	2300	2300
48	2000	3000	2000	2333,333
72	2700	3500	2500	2900
96	3500	3700	3000	3400

Tabela 6. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Lulas (G) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 8G
0	10900	21200	11100	14400
24	10900	17400	19800	16033,33
48	11600	16200	15800	14533,33
72	30100	33600	32800	32166,67
96	18500	29400	36000	27966,67

Tabela 7. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Carne vermelha (H) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 8H
0	49000	47300	47300	47866,67
24	43600	52900	54000	50166,67
48	49200	63800	41400	51466,67
72	54700	51200	55700	53866,67
96	129000	154000	117000	133333,3

Tabela 8. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Camarão (I) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4 °C +-0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 8I
0	48000	42200	43600	44600
24	38400	36200	52300	42300

48	267000	114000	139000	173333,3
72	446000	726000	636000	602666,7
96	800000	830000	750000	793333,3

Tabela 9. Valores obtidos para o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em Batatas (L) durante 96 horas, a temperatura de refrigeração (4 °C ±0,5), expressos em UFC/mL.

Período	Réplica A	Réplica B	Réplica C	Média 8L
0	19400	25900	19200	21500
24	15800	12100	18100	15333,33
48	15100	14200	17200	15500
72	19900	19600	23600	21033,33
96	364000	383000	1043000	596666,7