

MODELAGEM DO COMPORTAMENTO DE *Listeria innocua* DURANTE A PRODUÇÃO DE QUEIJO ARTESANAL

Beatriz de Abreu Cespi¹; Raquel Oliveira²; Cynthia Jurkiewicz Kunigk³

¹ Aluno de Iniciação Científica da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);

² Aluno de Doutorado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP);

³ Professor da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. *O desenvolvimento de bactérias patogênicas em produtos processados, armazenados sob refrigeração por longos períodos e consumidos sem aquecimento, como os queijos, é uma grande preocupação para produtores e comerciantes. Dentre as bactérias patogênicas relacionadas à surtos veiculados por queijos, ressalta-se a espécie Listeria monocytogenes. Com o intuito de contribuir com a segurança microbiológica de queijos artesanais, foi realizada nesse trabalho a modelagem do comportamento de L. innocua, bactéria não patogênica, porém com comportamento similar ao de L. monocytogenes, durante o processo de produção e maturação de um queijo artesanal. Foram produzidos queijos contaminados com L. innocua e queijos controles (sem adição de Listeria) com base no processo utilizado por produtores da região da Serra da Canastra (MG), entretanto foi utilizado leite pasteurizado ao invés de leite cru. O leite foi contaminado com uma população inicial de Listeria innocua $5 \cdot 10^2$ UFC·mL⁻¹. Amostras de queijos foram retiradas durante as primeiras 24 h de produção e semanalmente durante 22 dias de maturação a 20°C para quantificação de L. innocua, coliformes e bactérias lácticas. Os resultados mostraram que durante as primeiras 24 h houve um aumento de 3 Log UFC·g⁻¹ na contagem de L. innocua, 4 Log UFC·g⁻¹ na de bactérias lácticas no queijo contaminado e 3 Log UFC·g⁻¹ no queijo controle. Durante a maturação houve redução das contagens de todas as bactérias avaliadas, entretanto o número de L. innocua reduziu em apenas 1 Log UFC·g⁻¹ após 22 dias, indicando que este período de maturação não foi suficiente para garantir a segurança do produto.*

Introdução

Microrganismos do gênero *Listeria* são gram positivos, anaeróbios e não produzem esporos (Bergey's, 2009). Fazem parte desse gênero, seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi*, sendo duas delas consideradas patogênicas: *L. monocytogenes* (humanos) e *L. ivanovii* (outros mamíferos) (Ryser & Marth, 2007; Rocourt; Buchrieser, 2007). Todas as espécies são móveis por flagelos peritríqueos quando cultivadas a temperaturas entre 20 - 25 °C e imóveis a 37 °C (Barancelli *et al.*, 2011).

Essas bactérias são consideradas psicrotróficas, portanto se multiplicam em temperaturas de refrigeração. As temperaturas nas quais é possível haver crescimento desses microrganismos estão compreendidas entre 0,4 °C e 50 °C (Juntilla *et al.*, 1988), mas a temperatura ótima de crescimento varia de 30-37°C. Em relação ao pH, o crescimento ocorre preferencialmente em meio neutro, entre 6 e 9, entretanto, há casos na literatura em que houve multiplicação do microrganismo em valores de pH em torno de 4. Trata-se de um microrganismo onipresente, podendo ser encontrado em solos, água, animais e em diversos ambientes, como nas indústrias alimentícias (Bergey's, 2009; Barancelli *et al.*, 2011).

A espécie *L. monocytogenes* é resistente a condições ambientais adversas como por exemplo baixo pH e altas concentrações de NaCl, podendo sobreviver por mais de 100 dias a 4 °C em meio contendo entre 10,5 e 30,5 % de sal, mas é sensível à pasteurização, não sobrevivendo ao aquecimento a 60 °C por 30 minutos (Uboldi; Eiroa, 1990; Bergey's, 2009).

L. monocytogenes é responsável por causar listeriose em humanos, doença transmitida por alimentos, com alta taxa de mortalidade (20 % - 40 %) e hospitalização. Em adultos saudáveis a doença se manifesta com sintomas iguais ao de uma gripe. Entretanto, em grupos de risco (mulheres grávidas, idosos, recém-nascidos e pessoas com imunidade comprometida) a listeriose pode causar encefalites, meningites, aborto e até mesmo a morte (McIntery *et al.*, 2015; Schlech and Acheson, 2000).

L. monocytogenes é uma grande preocupação para as indústrias alimentícias, uma vez que a listeriose se dá principalmente por meio da ingestão de alimentos contaminados por essa bactéria, geralmente processados, armazenados sob refrigeração por longos períodos e consumidos sem aquecimento, como ocorre com os produtos de laticínios (McLauchlin, 1996). A bactéria também já foi encontrada em salada de repolho, sorvete, iogurte, carne de frango cozida refrigerada, carnes malcozidas, manteiga e leite pasteurizado. Dentre os produtos lácteos, os queijos são os mais comumente contaminados por essa bactéria, principalmente, os de alta e média umidade e produzidos com leite cru (PRNewswire, 2017; Abrahao *et al.*, 2008; Barros, 2005; Borges *et al.*, 2009).

Estudos tem mostrado que a incidência de *L. monocytogenes* em queijos possui grandes variações (entre 0 e 46 %) decorrentes principalmente do tipo de queijo, e as maiores taxas de prevalência ocorrem em queijos macios (Pintado *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 1998). A prevalência da bactéria também é maior em queijos produzidos com leite cru. Silva *et al.* (1998) observaram em queijo Minas frescal artesanal a presença de *L. monocytogenes* em 41 % dos queijos feitos com leite cru, e de 6 % nos produzido com leite pasteurizado.

Na indústria de laticínios, as principais fontes de contaminação pela bactéria patogênica são: leite cru, os utensílios e os equipamentos contaminados, as botas e roupas dos trabalhadores contaminado pelo solo, o ar, o sistema de ventilação, além da possibilidade de transmissão da bactéria por operários ou visitantes doentes (Swaminathan, 2001). A contaminação cruzada e a contaminação pós-produção também são muito comuns de acontecer.

O primeiro surto reportado de listeriose associado ao consumo de queijo ocorreu nos Estados Unidos em 1985 (Linnan *et al.*, 1988), e foi causado por um queijo fresco. Desde então, um grande número de surtos de listeriose associados ao consumo de queijo aconteceram ao redor do mundo com fatalidades reportadas. Esses surtos, confirmados no Canadá, Estados Unidos e Europa na década de 80, fizeram com que *L. monocytogenes* fosse incluída na lista de patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos (Ryser, 1999).

De acordo com dados do CDC (Centro de Controle e Prevenção de Doenças), entre 1998 e 2017, houve 78 surtos de listeriose nos Estados Unidos. Como consequência desses surtos, 940 pessoas ficaram doentes, 686 ficaram hospitalizadas e 140 morreram. O ano de 2014 contabilizou 13 surtos, correspondendo ao ano com maior número de ocorrências.

Em 2018, foram reportados na Europa 2549 casos de listeriose, com taxa de letalidade elevada (15 %), tornando a listeriose uma das doenças de origem alimentar mais graves da Europa (EFSA, 2019).

No Brasil, embora, *L. monocytogenes* tenha sido isolada de vários tipos de alimentos, inclusive os produtos lácteos, ainda não foi relatado nenhum surto ou caso esporádico. No país, os queijos Minas frescal e coalho são os mais estudados, e os frescais elaborados com leite cru são os mais contaminados com *L. monocytogenes* (Borges *et al.*, 2009).

De acordo com a Instrução Normativa nº 60 de 2019, da ANVISA, é estabelecido o limite de *L. monocytogenes* de 10^2 UFC·25 g⁻¹ em alimentos prontos para o consumo.

De forma a contribuir com a segurança da ingestão de queijos, tornando o alimento mais seguro, métodos preditivos passaram a ser estudados e utilizados para modelagem do crescimento e sobrevivência dessas bactérias patogênicas nos produtos, podendo assim, prever seu comportamento no alimento (Schvartzman *et al.*, 2010).

Esse projeto tem por objetivo simular uma produção de queijo artesanal em laboratório e modelar o comportamento de *L. innocua*, bactérias lácticas durante sua produção e maturação, de maneira a contribuir com a segurança de queijos artesanais.

Material e Métodos

A seguir estão descritos os procedimentos e matérias para a produção do queijo artesanal, análises microbiológicas, análises físico-químicas e ajuste dos modelos de crescimento nos períodos de produção e maturação do queijo.

Leite Pasteurizado

O leite pasteurizado tipo A (Fazenda Bela Vista) foi utilizado para a produção do queijo artesanal. O produto foi obtido em um mercado da região e armazenado em refrigeração (4 a 7 °C) até o momento do processo.

Listeria innocua

A ativação da cepa de *Listeria innocua* (FIOCRUZ 047) foi realizada em duas etapas. A bactéria, mantida -18 °C em caldo TSB com 20 % de glicerol, foi inoculada em 50 mL de caldo TSB-YE (tryptic soy broth – yeast extract) e incubada a 36 ± 1 °C durante aproximadamente 18 horas. Uma alíquota de 1 mL deste caldo foi transferida novamente para 50 mL do mesmo meio de cultura e incubada novamente em mesma temperatura por 24 h. A população de *L. innocua* no caldo foi determinada e a quantidade de inóculo a ser adicionada ao leite foi calculada para obter uma concentração inicial de aproximadamente 10^2 UFC.mL⁻¹.

Pingo

O fermento endógeno (pingo), foi fornecido por um produtor de queijo Canastra, em São Roque de Minas, MG. O fermento foi mantido congelado com 20 % de glicerol até momentos antes da produção do queijo, quando foi transferido para um refrigerador (4 a 7 °C) para ser descongelado.

Coalho

Para coagulação da massa, foi utilizado um coalho industrial líquido (Clerici, Itália), contendo quimosina e pepsina bovinas.

Produção do queijo artesanal

O queijo artesanal foi produzido com base no processo de fabricação de produtores da Serra da Canastra, Minas Gerais. Foram produzidos 4 queijos, sendo 2 contaminados com *L. innocua*, e 2 controles (sem adição de *Listeria*).

Para a produção do queijo com *Listeria innocua*, o leite pasteurizado foi aquecido até aproximadamente 38 °C e transferido para balde de polipropileno. Em seguida, o pingo foi adicionado ao leite juntamente com o coalho industrial líquido (Clerici, Itália), ambos em uma concentração de 0,3 %. Em seguida, foram adicionados 0,02 mL do inóculo afim de obter uma população inicial de aproximadamente 10^2 UFC.mL⁻¹. O leite foi mantido em repouso por 40 minutos para a coagulação da massa e cortado manualmente com o auxílio de uma escumadeira (Figura 1).

Figura 1 – coagulação da massa



Fonte: A Autora (2020).

A massa foi mantida em repouso e a dessoragem foi realizada. A prensagem foi realizada manualmente para retirar o excesso de soro ainda presente no queijo. Após a retirada do soro com o auxílio do tecido sintético (Figura 2), a massa foi transferida, com o auxílio de uma peneira, para formas plásticas circulares.

Figura 2 – Prensagem manual



Fonte: A Autora (2020).

Duas salgas foram realizadas, uma de cada lado do queijo, utilizando 7 g de sal de cozinha. Após 6 horas da primeira salga, o excesso de sal foi retirado e foi repetido o processo de salga na outra superfície do queijo (Figura 3).

Figura 3 – 1ª Salga



Fonte: A Autora (2020).

Após 12 horas da segunda salga, o excesso de sal foi novamente retirado e os queijos foram mantidos nas formas plásticas e colocados sobre uma tábua de madeira Pinus em câmara climática (420-CLDTS, EthikTechnology) a 20 °C e 65 % de umidade (Figura 4). Após 24 horas, os queijos foram desenformados, lavados com água e mantidos na incubadora para maturação por 22 dias, sendo virados, lavados e lixados a cada dois dias.

Figura 4 – Queijos desenformados em incubadora



Fonte: A Autora (2020).

O mesmo processo foi feito para os queijos controles, simultaneamente aos contaminados, porém sem a etapa de adição do inóculo ao leite.

Análises Microbiológicas

As amostras utilizadas para a realização das análises microbiológicas foram retiradas durante a produção do queijo e ao longo dos 22 dias de maturação. Foram realizadas análises de coliformes totais, bactérias lácticas e *Listeria innocua* no leite, no pingo, no leite com pingo, nas etapas de produção e maturação do queijo.

Para a realização das análises, amostras de 10 gramas de queijo foram diluídas em 90 mL de solução salina (0,85 %) e homogeneizadas em Stomacher 400 (Seward, Inglaterra) por 60 segundos a 230 rpm. No caso de amostras líquidas, 1 mL de amostra foi diluída em 9 mL de solução salina (0,85 %) (Midura e Bryant, 2001).

As diluições subsequentes foram realizadas transferindo-se 1 mL da diluição anterior para um tubo contendo 9 mL de solução salina e homogeneizadas em agitador de tubos 251 (Fanem, Brasil).

A análise de *Listeria innocua*, foi baseada no método FDA/BAM (Food and Drug Administration/Bacterial Analytical Manual) 10:2016. Foi utilizado o plaqueamento em superfície em meio de cultura ágar PALCAM e incubação a 37 ± 1 °C de 18 a 24 horas.

A análise de coliformes e bactérias lácticas foi realizada segundo a metodologia APHA (American Public Health Association). O ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) e plaqueamento em profundidade com sobrecamada foi utilizado para enumeração de bactérias lácticas. A incubação foi feita a 37 ± 1 °C por 48 ± 3 horas.

Por fim, o meio de cultura VRBA (Violet Red Bile Agar) foi utilizado para enumeração de coliformes. Realizou-se o plaqueamento em profundidade com sobrecamada do meio e incubação 37 ± 1 °C por 18 a 24 horas.

Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas apenas nos queijos controles, que não estavam contaminados com *L. innocua*. Foi utilizado um pHmetro (TECNAL, Modelo TEC-2) para a obtenção dos valores de pH, de acordo com o método oficial da AOAC 920.124. A atividade de água foi determinada no equipamento AquaLab 3TE (DECAGON DEVICES, INC).

Modelagem do crescimento das bactérias

Os ajustes das curvas de crescimento das bactérias foram realizados utilizando o software IPMP (Integrated Predictive Modeling Program). Foram utilizados os modelos, logístico, sem fase lag (equação 1) e de Baranyi (equação 2). Para avaliação da qualidade dos ajustes, foi calculado o coeficiente de determinação R^2 . A seguir estão representadas as equações dos modelos utilizados, onde Y_0 é a concentração inicial de microrganismos, Y_{max} é a concentração máxima de microrganismos, μ_{max} é a velocidade máxima de crescimento e h_0 é um parâmetro teórico que expressa o estado fisiológico inicial das células.

$$Y(t) = Y_0 + Y_{max} - \ln[e^{Y_0} + (e^{Y_{max}} - e^{T_0})e^{-\mu_{max} \cdot t}] \quad \text{Equação 1}$$

$$Y(t) = Y_0 + \mu_{max} \cdot A(t) - \ln\left\{1 + \frac{\exp[\mu_{max} \cdot A(t)] - 1}{\exp(Y_{max} - Y_0)}\right\} \quad \text{Equação 2}$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln[\exp(-\mu_{max} t) + \exp(-h_0) - \exp(-\mu_{max} t - h_0)]$$

Resultados e Discussão

Os resultados das análises físico-químicas realizadas no queijo não contaminado estão apresentados nas Tabelas 1 e 2:

Tabela 1 – Valores experimentais de pH durante a produção e maturação de queijo não contaminado.

Amostragem	pH
Leite + pingo	6,67
Após coagulação	6,62
Início da 1ª salga	6,90
3 horas após 1ª salga	6,87
Início da 2ª salga	6,83
1º dia de maturação	6,19
6º dia de maturação	5,49
15º dia de maturação	5,39
19º dia de maturação	5,42
22º dia de maturação	5,28

Tabela 2 – Valores experimentais de Aw durante a maturação de queijo não contaminado.

Amostragem	Aw
1º dia de maturação	0,96
6º dia de maturação	0,94
15º dia de maturação	nd
19º dia de maturação	nd
22º dia de maturação	0,90

Os resultados apresentados nas tabelas indicam que a atividade de água do queijo diminuiu durante a maturação, enquanto o pH começou a diminuir logo após a primeira salga. Entretanto, a maior redução de pH ocorre durante o início maturação. A redução do pH é oriunda da fermentação da lactose pelas bactérias lácticas, havendo liberação de ácido láctico no meio. A redução da atividade de água do queijo ocorre devido à perda de água para o ambiente que foi mantido com umidade de 65 %.

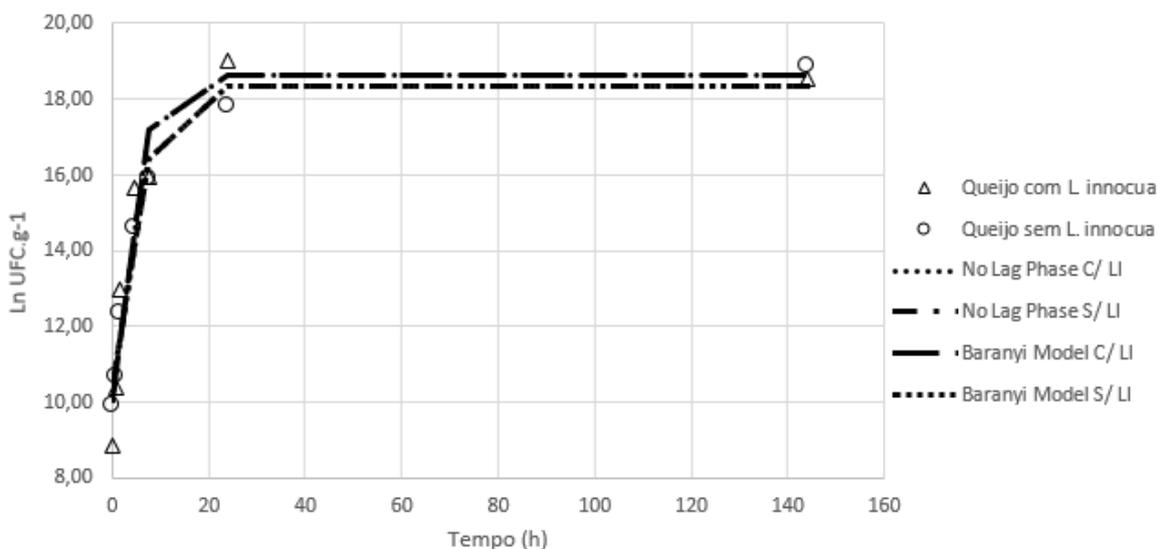
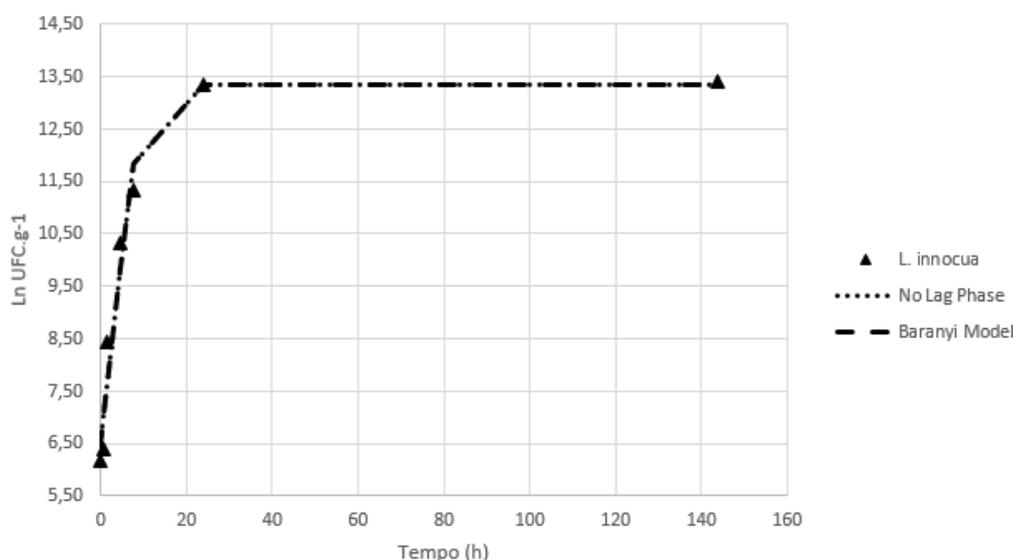
As Tabelas 3 e 4 e Figuras 5 e 6 mostram os resultados das contagens de *L. innocua*, bactérias lácticas e coliformes durante a produção e maturação dos queijos.

Tabela 3 – Contagens de *L. innocua* (UFC/g), coliformes (UFC/g) e bactérias lácticas (UFC/g) durante a produção e maturação de queijo contaminado.

Tempo (h)	Amostragem	<i>L. innocua</i>	Coliformes	Bactérias lácticas
0	Leite + pingo + <i>Listeria</i>	$4,8 \cdot 10^2$	<1	$7,0 \cdot 10^3$
0,8	Após coagulação	$6,1 \cdot 10^2$	<1	$3,2 \cdot 10^4$
1,5	Início da 1ª salga	$4,6 \cdot 10^3$	<10	$4,3 \cdot 10^5$
4,5	3 horas após 1ª salga	$3,1 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^1$	$6,2 \cdot 10^6$
7,5	Início da 2ª salga	$8,2 \cdot 10^4$	$5,0 \cdot 10^1$	$8,5 \cdot 10^6$
24	1º dia de maturação	$6,3 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^8$
144	6º dia de maturação	$6,7 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^8$
360	15º dia de maturação	$2,1 \cdot 10^5$	< 10	$1,3 \cdot 10^7$
456	19º dia de maturação	$6,5 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^1$	$1,3 \cdot 10^7$
528	22º dia de maturação	$1,8 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^1$	$1,1 \cdot 10^7$

Tabela 4 – Contagens de coliformes (UFC/g) e bactérias lácticas (UFC/g) durante a produção e maturação de queijo não contaminado.

Tempo (h)	Amostragem	Coliformes	Bactérias lácticas
0	Leite + pingo	< 1	$2,0 \cdot 10^4$
0,8	Após coagulação	< 1	$4,4 \cdot 10^4$
1,5	Início da 1ª salga	< 10	$2,3 \cdot 10^5$
4,5	3 horas após 1ª salga	< 10	$2,2 \cdot 10^6$
7,5	Início da 2ª salga	< 10	$8,2 \cdot 10^6$
24	1º dia de maturação	< 100	$5,5 \cdot 10^7$
144	6º dia de maturação	< 10	$1,6 \cdot 10^8$
360	15º dia de maturação	$2,0 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^7$
456	19º dia de maturação	< 10	$1,3 \cdot 10^7$
528	22º dia de maturação	< 10	$1,5 \cdot 10^7$



De acordo com os resultados apresentados nas tabelas 3 e 4, percebe-se que durante as primeiras 24 h de produção do queijo, houve um crescimento de *L. innocua* e de bactérias lácticas

em ambos os queijos, enquanto de coliformes apenas no queijo contaminado. Entretanto, observa-se que a partir do 6º dia de maturação, a contagem de bactérias começa a decair. As bactérias lácticas atingiram sua maior contagem no 6º dia de maturação, tanto no queijo contaminado como no controle, com $1,8 \cdot 10^8$ e $1,6 \cdot 10^8$ UFC.g⁻¹, respectivamente. O mesmo ocorreu para *L. innocua*, que teve sua contagem máxima no 6º dia de maturação, atingindo $6,7 \cdot 10^5$ UFC.g⁻¹. A contagem de *Listeria* teve redução de apenas 1 Log UFC.g⁻¹ até o último dia de maturação analisado, permanecendo com uma população acima do limite estabelecido pela legislação.

A etapa de maturação do queijo é a principal responsável pela redução de contagem das bactérias nos queijos devido à diminuição da atividade de água e do pH.

A contagem de coliformes permaneceu baixa em todo o período de produção dos queijos, a máxima contagem foi observada no queijo contaminado com *Listeria* no 6º dia de produção ($1,1 \cdot 10^3$). No queijo sem *Listeria*, a maior contagem de coliformes ocorreu no 15º dia ($2,0 \cdot 10^2$), enquanto nos demais períodos analisados a população estava abaixo do limite de detecção do método.

Para os ajustes dos modelos os valores das contagens foram transformados em ln. As figuras 5 e 6 apresentam os dados experimentais e os ajustes dos modelos para o crescimento de *Listeria innocua* e de bactérias lácticas, respectivamente.

Os valores da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), contagem inicial de bactérias (ln UFC.g⁻¹), contagem máxima de bactérias (ln UFC.g⁻¹), o parâmetro teórico h_0 e o coeficiente de determinação (R^2) para os ajustes realizados estão representados nas Tabelas 5 e 6:

Tabela 5 – Parâmetros obtidos para crescimento de *L. innocua* a partir dos ajustes realizados no software IPMP.

Modelo	Y ₀ (ln UFC.g ⁻¹)	Y _{max} (ln UFC.g ⁻¹)	μ_{\max} (h ⁻¹)	h ₀	R ²
Logístico	6,5	13,3	0,75	-	0,96
Baranyi	6,5	13,3	0,75	0	0,96

Tabela 6 – Parâmetros obtidos para crescimento de bactérias lácticas a partir dos ajustes realizados no software IPMP.

Queijo	Modelo	Y ₀ (ln UFC.g ⁻¹)	Y _{max} (ln UFC.g ⁻¹)	μ_{\max} (h ⁻¹)	h ₀	R ²
Contaminado	Logístico	10,1	18,6	0,98	-	0,91
	Baranyi	10,1	18,6	0,98	0	0,91
Não contaminado	Logístico	10,4	18,3	0,82	-	0,97
	Baranyi	10,4	18,3	0,82	0	0,97

Em relação à modelagem para *L. innocua*, os dois modelos foram bem ajustados, ambos com coeficiente de determinação R^2 de 0,96. Os valores dos parâmetros também foram os mesmos (y_{\max} 5,8 Log UFC.g⁻¹; y_0 2,8 Log UFC.g⁻¹, e μ_{\max} 0,75 h⁻¹), o que era esperado, já que h_0 foi fixado em 0, situação em que a bactéria inicia o crescimento na fase exponencial, sem a presença de fase lag.

O mesmo acontece para bactérias lácticas. Para o queijo contaminado, ambos os modelos foram ajustados com coeficiente de determinação R^2 de 0,91 e com valores dos parâmetros iguais (y_{\max} 8,1 Log UFC.g⁻¹; y_0 4,4 Log UFC.g⁻¹, e μ_{\max} 0,98 h⁻¹). Comparado ao queijo contaminado, o ajuste para o queijo controle foi melhor em ambos os modelos, com coeficientes de determinação R^2 de 0,97. Os valores dos parâmetros também foram iguais entre eles (y_{\max} 7,9 Log UFC.g⁻¹; y_0 4,5 Log UFC.g⁻¹, e μ_{\max} 0,82 h⁻¹). Embora a velocidade específica de crescimento (μ_{\max}) das bactérias

láticas no queijo contaminado tenha sido maior, a diferença é pequena para afirmar que a presença de *Listeria innocua* tenha influenciado o crescimento deste grupo de microrganismos.

Os resultados do trabalho mostraram que a presença de *Listeria* no leite é um grande perigo para o consumidor, já que o microrganismo irá se multiplicar rapidamente durante a produção do queijo e permanecerá em alta contagem durante mais de 22 dias.

Conclusões

O crescimento de *L. innocua* ocorre exponencialmente durante as primeiras 24 h de produção do queijo e o decaimento ocorre a partir do 6º dia de maturação. O mesmo aconteceu para as bactérias láticas.

Os modelos preditivos, logístico sem fase lag e de Baranyi, foram adequados para descrever o crescimento de *Listeria innocua* e de bactérias láticas durante 24 h de produção dos queijos artesanais.

A maturação do queijo por 22 dias não foi suficiente para reduzir a contagem de *Listeria innocua* para o nível considerado seguro estabelecido pela legislação brasileira para *L. monocytogenes*. A qualidade microbiológica do leite mostrou ser um fator determinante para a segurança de queijo artesanal maturado por 22 dias.

Referências Bibliográficas

Abraham et al. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos e sorvetes produzidos no Estado do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 44, n. 2, 2008.

APHA. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5a Ed., 2015. Washington, DC.

AOAC. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 18a Ed., Cap 33, 2005. Gaithersburg, Maryland, USA.

Bacteriological Analytical Manual (BAM). U.S. Food & Drug Administration, 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>. Acesso em: 21 nov. 2020.

Barancelli et al. *Listeria monocytogenes*: Ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. São Paulo: Arquivo do Instituto Biológico, vol. 78, no. 1, 2011.

Borges et al. *Listeria monocytogenes* em Leite e Produtos Lácteos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), 2009.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific topic: *Listeria*. 2019. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/listeria>. Acesso em: 21 nov. 2020.

Exame, PRNewswire. Tecnologia SilverShield na Microban: Redução da contaminação por *Listeria monocytogenes* em unidades de refrigeração. Disponível em: <https://exame.com/negocios/releases/tecnologia-silvershield-da-microban-reducao-da-contaminacao-por-listeria-monocytogenes-em-unidades-de-refrigeracao/>. Acesso em: 21 nov. 2020.

Junttila et al. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. Reino Unido: *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 65, issue 4, 1998.

Linnan et al. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New England Journal of Medicine*, vol. 319, no. 13, 1988.

MAPA. Instrução Normativa N°60, de 23 de dezembro de 2019. *Diário Oficial da União*. 2019.

McIntery et al. Listeriosis Outbreaks in British Columbia, Canada, Caused by Soft Ripened Cheese Contaminated from Environmental Sources. *BioMed Research International*, 2015.

McLauchlin J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*, v.7, n.4/5, 1996.

Pintado et al. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiology*, vol. 22, issue 1, 2005.

- Rocourt, J.; Buchrieser, C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH E.H. *Listeria*, Listeriose, and Food Safety. 3a ed. 2007.
- Silva et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 3, 1998.
- Schvartzman et al. Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurised or raw milk. *International Journal of Food Microbiology*. 2010.
- Swaminathan, B. *Listeria monocytogenes*. *Food microbiology, fundamentals and frontiers* 2nd ed., chap. 18, 2001.
- Uboldi-Eiroa, M. N. *Listeria monocytogenes* – Características, ocorrência e desenvolvimento em alimentos. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, vol. 20, no. 1, 1990.