

## MODELAGEM DO COMPORTAMENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DURANTE A MATURAÇÃO E ESTOCAGEM DE SORVETES

Palavras-Chave: [*LISTERIA MONOCYTOGENES*], [SEGURANÇA DE ALIMENTOS], [MICROBIOLOGIA PREDITIVA]

Autores: JULIA CRISTINA DE LIMA PAIVA [COTUCA/UNICAMP], LÍVIA CAROLINE SANTOS DA PAZ [COTUCA/UNICAMP], LÍVIA YURIE NABESHIMA HASHIMOTO [COTUCA/UNICAMP], MARIANA JACQUES MARTINELLI [COTUCA/UNICAMP], CAROLINE HECKLER [FEA/UNICAMP], JULIANA SILVA DA GRAÇA [FEA/UNICAMP], LARISSA PEREIRA MARGALHO [FEA/UNICAMP], ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA [FEA/UNICAMP]

Prof. ARTHUR Kael RODRIGUES DA PIA (orientador) [COTUCA/UNICAMP]

### INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria gram-positiva, em formato de bastonete, não formadora de esporos, anaeróbia facultativa, com crescimento ótimo entre 30 °C e 36 °C, embora seja capaz de se multiplicar em temperaturas entre 1 °C e 45 °C, fazendo com que seja um microrganismo psicotrófico, isto é, capaz de se desenvolver em temperaturas de refrigeração. A atividade de água viável para o seu desenvolvimento varia de 0,900 a 0,970, enquanto o pH varia de 4,5 a 9,0, sendo o pH ótimo entre 6,0 e 8,0 (BATT, 2014; FARLEY, 2018).

Este patógeno é responsável por causar a listeriose, doença que atinge, sobretudo indivíduos imunodeprimidos - como grávidas, idosos, recém-nascidos e portadores de transplantes - podendo partir de sintomas como gastroenterites, febre, e náuseas à graves complicações como septicemia, encefalites, infecções diversas e meningites. Sua transmissão se dá principalmente pelo consumo de alimentos contaminados, especialmente produtos lácteos e é responsável, por ano, por aproximadamente 1600 casos e mais de 1400 hospitalizações (BATT, 2014; FARLEY, 2018).

Mesmo sendo inativada em um processo de pasteurização convencional, a capacidade de *L. monocytogenes* de crescer em temperaturas de refrigeração causa problemas particulares em alimentos armazenados nestas temperaturas. Além disso, também é capaz de formar biofilmes, se aderindo às superfícies de equipamentos e tubulações industriais, o que aumenta as chances de contaminação pós-pasteurização (FARLEY, 2018).

Esses fatores fazem com que o sorvete, produto pertencente à classe dos gelados comestíveis, esteja envolvido em casos de surtos de listeriose. Desde 1985, foram emitidos mais de 100 recalls para produtos lácteos contaminados com *Listeria*, sendo os principais

sorvete e queijo, com perdas financeiras de até US\$ 120 milhões. Três grandes surtos de listeriose ocorridos durante os anos 1980 - dois nos Estados Unidos e um na Suíça - estavam ligados à laticínios, mais especificamente ao consumo de leite pasteurizado (RYSER, 2002).

O sorvete de massa tradicional trata-se de uma emulsão preparada a partir de uma fonte de gordura, em geral creme de leite ou gordura vegetal, e proteínas, provenientes do leite, incorporada de ar e submetida ao congelamento; podendo apresentar adoçantes, estabilizantes, emulsificantes e saborizantes. As principais etapas de processamento do sorvete são apresentadas na Figura 1. Na etapa de maturação, a mistura é mantida sob constante agitação em temperaturas de 0 a 10 °C por um período de tempo que pode variar de 2 a 24 horas. Esta etapa promove a hidratação dos emulsificantes e o início da cristalização da gordura. O congelamento, realizado entre -4 e -9°C, consiste no batimento do sorvete, onde ocorre a incorporação de ar, formando a textura característica de sorvete. Por sua vez, o endurecimento acontece em um freezer de -20 a -25°C, por cerca de 12 horas, enquanto o armazenamento é realizado em temperaturas entre -20 e -25 °C, mantendo o produto em boas condições na faixa de 12 a 18 meses (GOFF e HARTEL, 2013; LIOU, 2006).

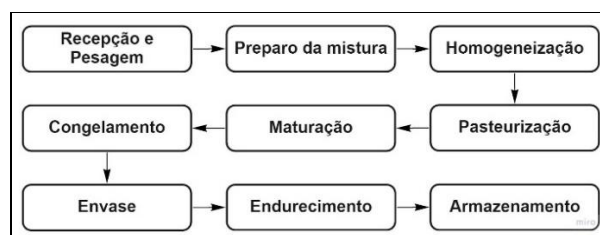


Figura 1 - Fluxograma das principais etapas do processamento de sorvetes. Fonte: adaptado de GOFF e HARTEL (2013)

A microbiologia preditiva é uma área da microbiologia que utiliza ferramentas estatísticas e

computacionais para obter modelos matemáticos que permitam prever o comportamento de um microrganismo sob determinadas condições, como é o caso dos modelos ditos primários e dos secundários. Modelos primários são cinéticos, isto é, descrevem a variação da população microbiana em função do tempo, podendo ser de inativação, sobrevivência ou crescimento. Estes últimos são aqueles que descrevem o aumento populacional microbiano (BUCHANAN, 1993; NAKASHIMA et al., 2000). Já os modelos secundários, por sua vez, descrevem o impacto das variáveis independentes, como por exemplo pH, atividade de água, e temperaturas de processo, nos parâmetros do modelo primário (BUCHANAN, 1993; SCHLEI et al., 2018).

Um dos mais importantes modelos primários de crescimento é o descrito por Baranyi e Roberts (1994). Este modelo apresenta os seguintes parâmetros: tempo de fase lag ( $\lambda$ ); taxa de crescimento na fase exponencial ( $\mu$ ); e população máxima atingida na fase estacionária ( $\log N_{\text{Máx}}$ ) (SCHLEI et al., 2018).

Na produção de sorvete, práticas de higiene inadequadas ou falhas no processamento podem favorecer a sobrevivência e a multiplicação de microrganismos como *L. monocytogenes* (GOFF e HARTEL, 2013; BATT, 2014). Assim, o objetivo deste trabalho é modelar o comportamento de *L. monocytogenes* em sorvete durante a etapa de maturação, a partir de simulações do processamento de sorvetes nos sabores morango, creme e chocolate, inoculados com *L. monocytogenes*, em 4 diferentes temperaturas de maturação (4°C, 7°C, 10°C e 12°C).

## METODOLOGIA

Para a realização do experimento, primeiramente foi padronizada uma formulação base de sorvete de creme, sendo adotada, após testes, a elaborada por CODY [et al.] (2007), com adaptações (KLESMANT et al., 2014). Foram também desenvolvidas formulações de sorvetes nos sabores morango e chocolate, a partir de alterações feitas na formulação base (GOFF e HARTEL, 2013). Assim, as formulações adotadas são descritas na tabela 1.

Para a produção do sorvete, primeiramente foi realizada a pesagem dos ingredientes (adquiridos em comércio local). Em seguida, foi realizada a mistura dos mesmos com o auxílio de um agitador mecânico (Quimis, 0250M2), com rotação a 200 rpm em um reator encamisado, ligado a um banho termostático (Biofoco, BF1BT5), em uma faixa de temperatura entre 40 e 50°C (KRAHL et al., 2019). Para facilitar a solubilização, o xarope de glicose, os estabilizantes e emulsificantes foram previamente hidratados com leite aquecido a aproximadamente 40 °C.

Ingrediente	Sorvete de		
	Creme	Morango	Chocolate
Leite integral (%)	58,72	38,67	54,72
Creme de leite (%)	20,00	20,00	20,00
Leite em pó desnatado (%)	4,00	4,00	5,00
Sacarose (%)	12,00	12,00	12,00
Xarope de glicose (%)	5,00	5,00	5,00
Polpa de morango (%)	-	20,00	-
Cacau em pó (%)	-	-	3,00
Ácido cítrico (%)	-	0,05	-
Mono e diglicerídeos de ácidos graxos <sup>(1)</sup> (%)	0,14	0,14	0,14
Carragena <sup>(2)</sup> (%)	0,028	0,028	0,028
Goma guar <sup>(2)</sup> (%)	0,112	0,112	0,112
Teor de gordura (%)	8,80	8,20	8,96

**Tabela 1** - Formulações dos sorvetes - <sup>(1)</sup>Emulsificante, <sup>(2)</sup>Estabilizantes - fonte: CODY et al (2007) (adaptado), GOFF e HARTEL (2013)

Em seguida, mistura obtida era homogeneizada por 1 minuto com auxílio de um *mixer* culinário (Mondial, Power mixer premium). Depois, seguiu-se para a pasteurização a 70 °C por 30 minutos (no mesmo sistema citado anteriormente) (MARSHALL, 2003). Encerrado o processamento térmico, a calda foi imediatamente transferida para um frasco estéril e resfriada em banho de gelo até atingir temperatura ambiente. Após isso, era submetida à maturação, na qual era realizada inoculação microbiana, sendo mantida sob agitação constante de 100 rpm nas temperaturas de 4, 7, 10 ou 12 °C (de acordo com o experimento).

Como inóculo foi utilizado um pool de três cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2b (CLIST52, CLIST55, CLIST57), previamente isoladas de sorvetes (GRAÇA et al., 2020). Primeiramente as cepas foram ativadas em tubos de 10 mL TSB-YE (Caldo de Soja Trypticase com 0,6% de Extrato de Levedura) e incubadas por 24 horas a 30 °C, sendo então repicada sob as mesmas condições. Após, os conteúdos dos tubos eram transferidos para frascos contendo 90 mL TSB-YE e incubados (30°C) em *shaker* (New Brunswick Scientific, PsycroTherm) a 150 rpm *overnight*.

As culturas obtidas eram centrifugadas à 4 °C, 8000 x g, por 15 min (ThermoScientific, Sorvall Legend XTR). Os pellets obtidos eram lavados com tampão salina fosfato pH 7,4±0,2 (PBS) por 3 vezes. O pellet final era ressuspenso em PBS, sendo o inóculo ajustado para 10<sup>9</sup> UFC/mL em espectrofotômetro (Beckman, DU640 B) utilizando-se  $\lambda = 625$  nm e curva de calibração previamente obtida. A partir disso, calculou-se o volume de suspensão que deveria ser inoculado na calda em maturação, desejando-se uma população inicial de 10<sup>2</sup> UFC/mL de alimento.

Após a inoculação, que ocorreu para cada temperatura de maturação e sabor de sorvete, o crescimento de *L. monocytogenes* foi acompanhado, sendo realizada a coletada de aproximadamente 15 pontos da amostra ao longo do processo. O microrganismo foi quantificado pela técnica de spread plate, em meio de cultura TSA-YE, sendo as placas incubada a 30 °C por 48 horas. Deste modo, era determinado, para cada ponto, a concentração de *L. monocytogenes*, em Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL) de sorvete. Todos os experimentos foram realizados em duplicata independentes, totalizando 24 ensaios.

O modelo descrito por Baranyi e Roberts (1994) - apresentado na Figura 2 – foi ajustado às curvas de crescimento para obtenção dos parâmetros cinéticos, sendo os cálculos feitos através do add-in para plataforma Microsoft Excel® DMFit. Como modelo secundário foi ajustado o modelo desenvolvido por Ratkowsky [et al.] (1982) – apresentado na Figura 3 – e os cálculos foram feitos com auxílio da plataforma Microsoft Excel®.

$$y(t) = y_0 + kA(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{kA(t)} - 1}{e^{y_{\max} - y_0}}\right)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{k} \ln\left(\frac{e^{kt} + q_0}{1 + q_0}\right)$$

$$\lambda = \frac{\ln(1 + \frac{1}{q_0})}{k}$$

**Figura 2:** Modelo primário de crescimento de Baranyi e Roberts - Onde:  $y(t)$ : quantidade de microrganismo no tempo  $t$ ;  $y_0$ : concentração inicial de microrganismos;  $k$ : velocidade de crescimento;  $y_{\max}$ : concentração máxima de microrganismos;  $q_0$ : parâmetro teórico que expressa o estado fisiológico inicial das células;  $\lambda$ : fase lag. Fonte: BARANYI e ROBERTS (1994).

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b \cdot (T - T_{\min})$$

$$\sqrt{\frac{1}{t_{\text{lag}}}} = b \cdot (T - T_{\min})$$

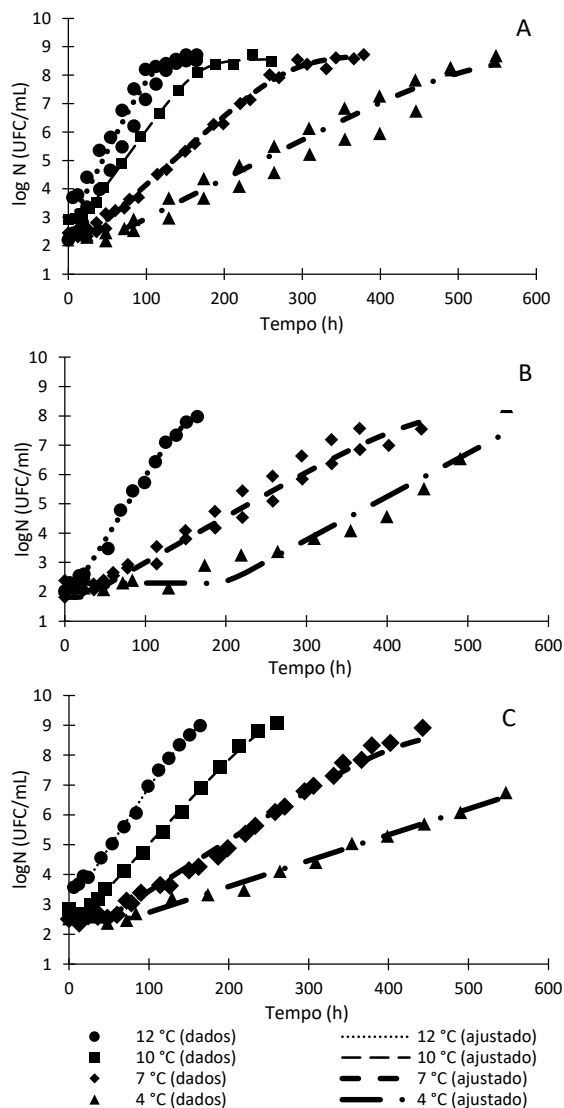
**Figura 3:** Modelo secundário da raiz quadrada de Ratkowsky- Onde:  $\mu_{\max}$ : taxa máxima de crescimento;  $T_{\min}$ : temperatura mínima;  $t_{\text{lag}}$ : tempo de fase lag. Fonte: RATKOWSKY (1982).

Os parâmetros cinéticos obtidos foram comparados estatisticamente a partir da Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey, para analisar a existência de diferença significativa entre as médias encontradas.

## RESULTADOS

O modelo primário de Baranyi e Roberts (1994) obteve um bom ajuste às curvas de crescimento geradas para cada temperatura (4 °C, 7 °C, 10 °C e 12°C) e matriz (Creme, Chocolate e Morango), vistas na Figura 4, todas com  $R^2$  maior que 0,98, exceto para a de morango a 4°C. Pode-se observar nas curvas de crescimento as 3 fases do crescimento bacteriano, exceto nas curvas de 4 °C de morango e chocolate e na

de 7 °C de chocolate que não foi possível alcançar a fase estacionária.



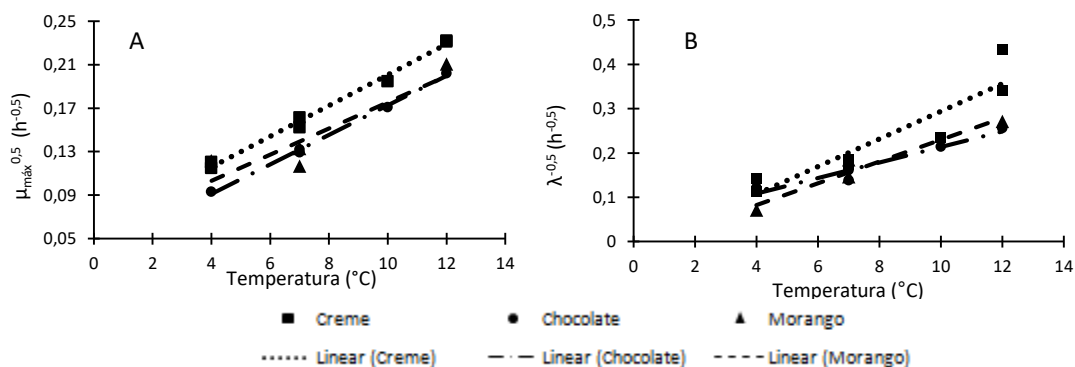
**Figura 4 -** Dados e curvas ajustadas do crescimento de *L. monocytogenes* em temperaturas de 4 °C, 7 °C, 10 °C e 12 °C na maturação do sorvete de creme (A), morango (B) e chocolate (C). Fonte: autoral

Através dos ajustes realizados foram obtidos os parâmetros cinéticos; tempo de fase lag ( $\lambda$ ), taxa de crescimento máxima ( $\mu$ ) e população máxima ( $\log N_{\max}$ ) que descrevem as fases lag, logarítmica e estacionária, respectivamente. Estes parâmetros, assim como dados físico-químicos (pH e  $A_w$ ) das formulações preparadas são apresentados na Tabela 2.

O efeito da temperatura na variação das taxas de crescimento e tempos de fase lag foi modelado seguindo o modelo de Ratkowsky (1982), conforme representado pelas curvas plotadas na Figura 5, que possuem  $R^2$  variando de 0,826 a 0,997, a partir destes foram obtidos os parâmetros do modelo secundário, apresentados na Tabela 3. Destaca-se que dados e repetições não apresentados na Tabela 2 e na Figura 4 são referentes a experimentos que se encontram em fase de coleta de dados.

Matriz	Temperatura (°C)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (h)	logN <sub>Max</sub> (UFC/mL)	R <sup>2</sup>
Sorvete de Creme (pH = 6,47±0,04; a <sub>w</sub> = 0,968±0,062)	4	0,0138±0,0009	64,3±20,7	8,73 <sup>(1)</sup>	0,9914
	7	0,0246±0,0021	31,2±2,3	8,71±0,18	0,9970
	10	0,0379 <sup>(1)</sup>	18,3 <sup>(1)</sup>	8,55 <sup>(1)</sup>	0,9985
	12	0,0537±0,0003	7,0±2,3	8,69±0,23	0,9438
Sorvete de Morango (pH = 5,32±0,04; a <sub>w</sub> = 0,973±0,005)	4	0,0148 <sup>(1)</sup>	200,0 <sup>(1)</sup>	<sup>(2)</sup>	0,9361
	7	0,0156±0,0029	38,1±12,3	8,39 <sup>(1)</sup>	0,9953
	10	<sup>(2)</sup>	<sup>(2)</sup>	<sup>(2)</sup>	<sup>(2)</sup>
	12	0,0443 <sup>(1)</sup>	13,6 <sup>(1)</sup>	8,33 <sup>(1)</sup>	0,9922
Sorvete de Chocolate (pH = 6,42±0,05; a <sub>w</sub> = 0,977±0,003)	4	0,00870 <sup>(1)</sup>	67,4 <sup>(1)</sup>	<sup>(2)</sup>	0,9908
	7	0,0171±0,0005	45,3±9,7	<sup>(2)</sup>	0,9960
	10	0,0292 <sup>(1)</sup>	21,7 <sup>(1)</sup>	9,81 <sup>(1)</sup>	0,9983
	12	0,0407 <sup>(1)</sup>	15,3 <sup>(1)</sup>	9,43 <sup>(1)</sup>	0,9960

**Tabela 2** - Parâmetros Cinéticos do modelo primário - <sup>(1)</sup> Duplicata do experimento encontra-se em andamento, <sup>(2)</sup> Experimento ainda não realizado. Fonte: autoral



**Figura 5** – Curvas do modelo secundário ajustado para (A) taxa de crescimento e (B) tempo de fase lag - fonte: autoral

Sabor do Sorvete	Parâmetros dos modelos secundários para $\mu$			Parâmetros dos modelos secundários para $\lambda$		
	b	T <sub>min</sub> (°C)	R <sup>2</sup>	b	T <sub>min</sub> (°C)	R <sup>2</sup>
Creme	0,0141	-6,74	0,99	0,0312	0,59	0,85
Morango	0,0120	-4,59	0,83	0,0245	0,64	0,95
Chocolate	0,0136	-2,71	0,99	0,0175	-2,19	0,94

**Tabela 3:** Parâmetros dos modelos secundários obtidos. Fonte: autoral

## DISCUSSÃO

*L. monocytogenes* foi capaz de se desenvolver em todas as temperaturas e matrizes, indicando que as formulações de sorvete fornecem condições necessárias para a multiplicação do microrganismo. A taxa de crescimento se apresentou diretamente proporcional à temperatura de maturação, variando de 0,0086 h<sup>-1</sup> a 4 °C (chocolate) até 0,0539 h<sup>-1</sup> a 12 °C (creme). A taxa de crescimento ( $\mu$ ) descreve a fase logarítmica, onde as células se dividem constantemente tornando o crescimento populacional exponencial. Segundo a ANOVA, para as temperaturas de 4, 7, 12 °C no sorvete de creme há diferença significativa entre todo  $\mu$  (P<0,05).

Em relação ao tempo de fase lag, a temperatura se mostrou inversamente proporcional, isto é, quanto maior a temperatura menor  $\lambda$ , variando de 5,3 h (Creme) na temperatura de 12 °C até 200,0 h (Morango) na temperatura de 4 °C. O tempo de fase lag é quando a população não se altera pois a bactéria está se adaptando ao meio e se preparando para a multiplicação celular. No caso do sorvete de creme, a diferença entre os períodos de fase lag nas temperaturas de 12 e 4 graus foi significativa

enquanto o de 7 °C não se diferenciou significativamente das temperaturas de 4 e 12 °C (P<0,05).

A temperatura é um fator extrínseco importante para o crescimento microbiano, no caso do frio, a bactéria sofre mudanças fisiológicas como a gelificação da membrana que altera a sua fluidez, além de outras mudanças fisiológicas que afetam o crescimento do microorganismo. *L. monocytogenes* cria, entretanto, mecanismos para continuar seu crescimento, como a alteração de compostos da membrana, permitindo a boa permeabilidade de nutrientes e de solutos osmoprotetores, e produção de proteínas de choque frio (SILVA, 2011). Ainda assim, não estando a bactéria em um ambiente com temperaturas ótimas, os processos enzimáticos e de transporte celular diminuem sua velocidade. Assim, quanto mais distante o ambiente se encontra da temperatura ótima de crescimento maior é o tempo de adaptação e menor a taxa de crescimento.

Além disso, a população máxima (N<sub>max</sub>) não apresentou grande diferença conforme a variação de temperatura. N<sub>max</sub> é atingida na fase estacionária na qual as velocidades de crescimento e de morte se igualam e a concentração da população se estabiliza. Esta variou de 8,5 a 9,8 log(UFC/mL). A temperatura não teve influência significativa no logN<sub>max</sub> pois este é limitado pela competição existente entre células bacterianas devido a produção de metabólitos tóxicos.

A partir da ANOVA, para a temperatura de 7°C nas diferentes matrizes, conclui-se que há diferença significativa na taxa de crescimento entre os sorvetes de

creme e morango e que o de chocolate não se diferencia significativamente dos outros dois (figura 5). A matriz de morango possui pH menor que as demais devido a presença da polpa de morango e de ácido cítrico, ficando fora da faixa de pH ótimo da *L. monocytogenes*. Nestas condições, a respiração celular é afetada devido a ação de enzimas e demora do transporte de nutrientes para dentro da célula, fazendo com que a taxa de crescimento diminua (LEPAGE et al., 1987). Ademais, a matriz de morango foi escolhida para representar os sorvetes frutados, que tendem a apresentar menores valores de pH, pois é o mais consumido dentre estes e pode ser usado como base para predição do crescimento do microrganismo alvo em outros sorvetes de características físico-químicas similares.

Apesar de ter diferença entre a taxa de crescimento do sorvete de chocolate e dos demais, esta não apresentou diferença significativa a 7°C. E nas outras temperaturas em que não obtivemos as duplicatas, os valores tem se apresentado menores que os de Creme e próximos do de Morango. Além disso, o tempo de fase lag entre as matrizes na temperatura de 7 °C não possui diferença significativa ( $P < 0,05$ ). A diferença obtida pode, a princípio, ser justificada pela presença de flavonoides no cacau (KATZ, 2011) que são conhecidos por terem provável ação antimicrobiana (CALATAYUD, 2013). Outra justificativa possível é a presença de compostos com altos pesos moleculares, como a melanoidina, que é resultado da reação de Maillard formada no processo de torração que o cacau sofre e que é considerada antimicrobiana.

Embora o sorvete sofra redução da carga microbiana no processo de pasteurização, ainda está sujeito a recontaminação ainda mais se houver formação de biofilmes e temperaturas entre a faixa de crescimento da *L. monocytogenes*. Assim, os parâmetros gerados neste trabalho podem ser utilizados para, por exemplo, avaliar processos industriais reais e estimar o crescimento de *Listeria* com base nas condições de processo aplicadas. Caso aconteça recontaminação em processos pós pasteurização; a maturação, etapa em que o sorvete fica de 2 a 24 horas em temperaturas de 0 °C a 12 °C, é uma etapa preocupante. Pois, baseando se nos dados obtidos esta bactéria seria capaz de se desenvolver e sair da fase lag a partir de 5 horas e crescer em até 1,2 log em 24 horas no pior cenário. Com os parâmetros obtidos então será possível prever o comportamento dessa bactéria se houver variação da temperatura. Assim, os modelos obtidos podem auxiliar indústrias e órgãos de controle na predição do comportamento da *L. monocytogenes* evitando ocorrência de surtos, contribuindo para a segurança dos consumidores. Para o uso do modelo nas indústrias é indicado que este passe por uma etapa de validação e que seja usado nas faixas de estudo (4 °C a 12°C).

## CONCLUSÃO

A partir dos modelos obtidos para as diferentes matrizes e temperaturas obtiveram-se parâmetros cinéticos de crescimento de *L. monocytogenes* que, como esperado, foram afetados pela temperatura. A redução do tempo de fase lag e aumento da taxa de crescimento, conforme aumento da

temperatura, puderam ser aferidas pelos modelos secundários gerados. Das matrizes analisadas, o sorvete de creme se apresentou, aparentemente, como a mais favorável para o crescimento do patógeno, possivelmente pois os outros sabores apresentam barreiras como menor pH ou compostos antimicrobianos. Deste modo, os modelos gerados podem contribuir para prever o comportamento de *L. monocytogenes* por indústrias, órgãos de controle e em outras pesquisas, favorecendo garantia da segurança microbiológica.

## BIBLIOGRAFIA

- BARANYI, J; ROBERTS, T.A. **A dynamic approach to predicting bacterial growth in food**. International Journal of Food Microbiology. v. 23, n.1, p.277–294, nov, 1994.
- BATT, C. A. **Listeria: *Listeria monocytogenes***. Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition. NY, USA: Elsevier Inc., 2014. p. 490–493..
- BUCHANAN, R. L. **Predictive food microbiology**. Trends in Food Science & Technology, v. 4, n. 1, p. 6-11, 1993.
- CALATAYUD, Marta, et al. **Active films based on cocoa extract with antioxidant, antimicrobial and biological application**, Food Chemistry, 2013.
- CODY, T. L. et al. **Evaluation of Rice Flour for Use in Vanilla Ice Cream**. Volume 90. Líbano: American Dairy Science Association, 2007.
- FARLEY, M. M. **Listeria monocytogenes**. [S.l.: s.n.], 2018. Disponível em: <[www.cdc.gov/pulsenet/](http://www.cdc.gov/pulsenet/)>.
- GOFF, H. D. HARTEL, R. W. **Ice Cream**. 7 ed. Estados Unidos, Nova Iorque: Springer Science, 2013.
- GRAÇA, J. et al. **Incidence, genetic characterization and thermal resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from ice cream**. Campinas, Brasil. 2020.
- KATZ, David L. et al. **Cocoa and Chocolate in Human Health and Disease**, Mary Ann Liebert, 2011.
- KLESMENT, T. et al. **Influence of guar gum/furcellaran and guar gum/carrageenan stabilizer systems on the rheological and sensorial properties of ice cream during storage**. ResearchGate, 2014. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/272709751>> . Acesso em: 27 Feb 2022.
- KRAHL, et al. **Ice Cream. Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color**. Geesthacht, Germany: Elsevier Inc., 2016. p. 198–207.
- LEPAGE, C. et al. **Changes in Membrane Lipid Composition of *Clostridium acetobutylicum* during AcetoneButanol Fermentation: Effects of Solvents, Growth Temperature and pH**, França, 1987.
- LIOU, Bo Kang. **Sensory analysis of low fat strawberry ice creams prepared with different flavor chemical and fat mimetics**, University of Missouri-Columbia, 2006.
- MARSHALL, R.T. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2 ed. Estados Unidos: Elsevier Science, 2003.
- NAKASHIMA, S.M.K. et al. **Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva**. Brazilian Journal of Food Technology, v. 3, p.41-45, 2000.
- RATKOWSKY, D. A. et al. **Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures**, J Bacteriol, 1982.
- RYSER, E. T. **Listeria Monocytogenes**, Elsevier Science Ltd, Michigan State University, 2002.
- SCHLEI, et al. **Microbiologia preditiva: aspectos gerais e tendências**. Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia, v.10, 2018.
- SILVA, Ana Carla Matos da. **A influência do tempo de refrigeração na virulência inicial de *Listeria monocytogenes***, Lisboa, 2010.