



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* E  
*STAPHYLOCCOCUS AUREUS* EM FRUTAS E VEGETAIS EXPOSTOS A  
DIFERENTES TEMPERATURAS E MODELAGEM PREDITIVA NOS  
ALIMENTOS DE MAIOR RISCO**

Caroline Isabel Kothe

Porto Alegre  
2017

**Caroline Isabel Kothe**

**AVALIAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* E  
*STAPHYLOCCOCUS AUREUS* EM FRUTAS E VEGETAIS EXPOSTOS A  
DIFERENTES TEMPERATURAS E MODELAGEM PREDITIVA NOS  
ALIMENTOS DE MAIOR RISCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Orientador:** Eduardo Cesar Tondo  
**Co-orientadora:** Patrícia da Silva Malheiros

Porto Alegre  
2017

## CIP - Catalogação na Publicação

Kothe, Caroline Isabel

Avaliação da multiplicação de Escherichia coli e Staphylococcus aureus em frutas e vegetais expostos a diferentes temperaturas e modelagem preditiva nos alimentos de maior risco / Caroline Isabel Kothe. -- 2017.

80 f.

Orientador: Eduardo César Tondo.

Coorientadora: Patrícia da Silva Malheiros.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. saladas. 2. microbiologia preditiva. 3. distribuição. I. Tondo, Eduardo César, orient. II. Malheiros, Patrícia da Silva, coorient. III. Título.

*“Um mestre na arte de viver não faz qualquer distinção nítida entre seu trabalho e sua obra; seu trabalho e seu lazer; sua mente e seu corpo; sua educação e sua recreação. Ele mal sabe qual é qual. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência através de tudo o que ele está fazendo e deixa os outros para determinar se ele está trabalhando ou se divertindo. Para si mesmo, ele sempre parece estar fazendo os dois!”*

***Lawrence Pearsall Jacks***

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

Autora: Caroline Isabel Kothe (Engenheira de Alimentos/ Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul)

Título da dissertação: Avaliação da multiplicação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em frutas e vegetais expostos a diferentes temperaturas e modelagem preditiva  
nos alimentos de maior risco

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de  
**MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Aprovada em: 04/04/2017

**Comissão Examinadora**

---

Prof. Dr. Caciano Pelayo Zapata Noreña  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof. Dra. Ana Beatriz Almeida de Oliveira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof. Dra. Karla Joseane Perez  
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo inicial avaliar a multiplicação de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em frutas e vegetais expostos a diferentes temperaturas. Para identificar as frutas e vegetais frequentemente servidos em *buffet*, foram visitados restaurantes comerciais ( $n=50$ ), onde os principais alimentos encontrados foram: cenoura ralada, brócolis, pepino, repolho verde, tomate, melancia e mamão. Amostras desses vegetais foram adquiridas em supermercado local e processadas ou preparadas conforme modo de consumo, sendo então contaminadas artificialmente com um *pool* de *S. aureus* e *E. coli*, separadamente, e expostos a 10, 20 e 30 °C. Os resultados desses experimentos demonstraram que não houve multiplicação dessas bactérias nas frutas e vegetais expostos a 10 °C durante 6 h. A 20 e 30 °C, *S. aureus* demonstrou multiplicação mais rápida no brócolis, onde a fase estacionária iniciou em menos de 2 h, possivelmente por este ser o único alimento cozido nesse estudo. Observou-se também que a 30 °C, *E. coli* se multiplicou em menos de 2 h nos seguintes alimentos: mamão, pepino, melancia e brócolis. Já no tomate, *S. aureus* não se multiplicou em nenhuma temperatura avaliada. No entanto, a população final de *E. coli* no tomate atingiu 9,7 log, em 24 h, a 30 °C, apesar do baixo pH (4,21). Por esse motivo e porque o tomate foi o vegetal mais frequentemente servido nos restaurantes comerciais avaliados, foi utilizado o modelo primário de Baranyi para modelar os parâmetros cinéticos de multiplicação e o modelo secundário de Ratkowsky para modelar a taxa de multiplicação e o tempo de fase *lag* em função da temperatura de *E. coli* no tomate, exposto a temperaturas de 10 a 37 °C. Os resultados obtidos indicaram que a fase *lag* da *E. coli* no tomate foi de 2,13 h e 2,46 h quando exposto a 37 e 30 °C, enquanto que a 20 e 10 °C, as fases *lag* foram de 15,6 h e 42,5 h, respectivamente. O modelo secundário foi integrado em uma simulação com dados nacionais de temperaturas reais coletados em planilhas de serviços de alimentação de 225 restaurantes de três regiões do Brasil (Sul, Sudeste e Norte/Nordeste). Aplicando o modelo gerado, foi observado que *E. coli* é capaz de se multiplicar em tomate em 1,58 h a 29,3 °C, temperatura mais crítica encontrada na cadeia de distribuição do tomate. Em seguida, realizou-se outro estudo no intuito de avaliar o comportamento de *S. aureus* em brócolis tratados termicamente, visto que este micro-organismo obteve um grande potencial de multiplicação nesse alimento. Também foram desenvolvidos modelos primário e secundário para avaliar a multiplicação do *S. aureus* em brócolis expostos a temperaturas de 10 a 37 °C. Nesse alimento, a fase *lag* de *S. aureus* foi de 1,4 h quando o vegetal foi exposto a 30 e 37 °C; enquanto que a 20 e 10 °C as fases *lag* foram de 5,3 h e 160 h, respectivamente. O modelo secundário foi capaz de descrever a influência da temperatura (de 10 a 37 °C) sobre a taxa de multiplicação e a fase *lag* de *S. aureus* em brócolis. Os resultados demonstraram que as frutas e vegetais avaliados podem ser distribuídas sob temperaturas de refrigeração de 10 °C ou menos e não devem ser mantidas mais de 2 h em temperaturas próximas de 30 a 37 °C, a fim de evitar a multiplicação bacteriana. Tais parâmetros podem contribuir na gestão de segurança dos alimentos em serviços de alimentação, prevenindo Doenças Transmitidas por Alimentos.

**Palavras-chave:** saladas, microbiologia preditiva, distribuição, tomate, brócolis

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the multiplication of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* on fruits and vegetables exposed to different temperatures. To identify the fruits and vegetables most frequently served in buffet, commercial restaurants ( $n=50$ ) were visited, where the main foods found were: grated carrots, broccoli, cucumber, green cabbage, tomato, watermelon and papaya. Samples of these vegetables were purchased from the local supermarket and processed or prepared according to the mode of consumption and were then artificially contaminated with a pool of *S. aureus* and *E. coli* separately and exposed at 10, 20 and 30 ° C. The results of these experiments demonstrated that these microorganisms did not grow on fruits and vegetables exposed to 10 °C during 6 h. At 20 and 30 °C, *S. aureus* showed faster multiplication on broccoli, where the stationary phase started in less than 2 h, possibly because this was the only food cooked in that study. It was also observed at 30 °C, where *E. coli* multiplied in less than 2 h in the following foods: papaya, cucumber, watermelon and broccoli. On tomato, *S. aureus* did not multiply at any evaluated temperature. However, the final *E. coli* population in this same food reached 9.7 log CFU/g in 24 h at 30 °C, despite the low fruit pH (4.21). For this reason, and because tomato was the most frequently served food in the evaluated commercial restaurants, the Baranyi primary model was used to model the kinetic parameters of multiplication and the Ratkowsky secondary model to model the multiplication rate and lag phase time as a function of the temperature of *E. coli* on tomato, which was exposed to temperatures of 10 to 37 °C. The results indicated that the lag phase of *E. coli* on tomato was 2.13 h and 2.46 h when exposed at 37 and 30 °C, respectively; while at 20 °C and 10 °C the lag phases were 15.6 h and 42.5 h, in that order. The secondary model was integrated in a simulation with national real temperature data collected in food service of 225 restaurants in three regions of Brazil (Southern, Southeast and North / Northeast). Applying the generated model, it was observed that *E. coli* was able to grow on tomato at 1.58 h at 29.3 °C, the most critical temperature found on tomato distribution chain. Another study developed was the behavior of *S. aureus* in heat treated broccoli, because this microorganism obtained a high growth potential for this food. Primary and secondary models were also developed to evaluate the behavior of *S. aureus* stored at 10-37 °C. The lag phase of broccoli was 1.4 h when the bacteria was exposed at 30 and 37 °C; while at 20 °C and 10 °C the lag phases were 5.3 h and 160 h, respectively. Secondary models were able to describe the influence of temperature (10-37 °C) on the growth rate and lag phase of *S. aureus* on broccoli. The results demonstrated that the evaluated fruits and vegetables can be distributed under refrigeration temperatures of 10 °C or less and should not be maintained for longer than 2 h at temperatures close to 30 to 37 °C in order to avoid bacterial multiplication. Such parameters can contribute to the management of food safety in food services, preventing Foodborne Diseases.

**Keywords:** salads, predictive microbiology, distribution, tomato, broccoli

## **Sumário**

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	OBJETIVOS.....	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1	Dados sobre o consumo de alimentos fora do domicílio .....	4
3.2	Consumo e contaminação de frutas e vegetais .....	5
3.3	Legislação .....	5
3.4	Doenças Transmissíveis por Alimentos.....	7
3.5	Boas Práticas.....	8
3.6	Comportamento dos micro-organismos .....	9
3.7	Microbiologia Preditiva .....	10
3.8	Micro-organismos de interesse na pesquisa.....	11
3.8.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
3.8.2	<i>Escherichia coli</i> .....	13
4	RESULTADOS.....	15
4.1	Artigo Científico 1 .....	16
4.2	Artigo Científico 2 .....	33
4.3	Artigo Científico 3 .....	47
5	DISCUSSÃO GERAL .....	59
6	CONCLUSÃO .....	65
7	REFERÊNCIAS .....	66

## **1 INTRODUÇÃO**

As constantes mudanças profissionais, culturais e econômicas que vem ocorrendo devido à globalização têm motivado um aumento significativo da alimentação fora dos domicílios (LIU et al., 2015; BEZERRA et al., 2015). Além disso, o consumo de frutas e vegetais frescos tem aumentado durante os últimos anos e, provavelmente, aumentará 8-9% nos próximos 5 anos em todo o mundo (PBH, 2015). Ainda que a alimentação fora de casa possa ser prática e facilitar a vida das pessoas, ela pode também gerar certo receio por parte dos consumidores no que diz respeito à segurança dos alimentos servidos (ALVES; UENO, 2010).

No Brasil, segundo registros de 2000 a 2016, os serviços de alimentação foram os locais onde mais ocorreram surtos alimentares, ficando atrás apenas das residências, onde a Vigilância Sanitária não tem acesso (BRASIL, 2016). O emprego inadequado da temperatura na preparação dos alimentos, bem como a conservação e exposição sob refrigeração imprópria, são fatores determinantes da sobrevivência e multiplicação de micro-organismos, o que pode resultar em surtos alimentares (WHO, 2006; MULLER, 2011). O descontrole do binômio tempo e temperatura na preparação de alimentos em serviços de alimentação é um dos principais fatores causais de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no Brasil (SOARES et al., 2009).

Dentre os diversos controles que a legislação vigente prevê (BRASIL, 2004; RIO GRANDE DO SUL, 2009), a temperatura de exposição dos alimentos frios é frequentemente uma inconformidade apresentada nos serviços de alimentação (FRANTZ et al., 2008). Muitos alimentos prontos para o consumo ficam em temperaturas inadequadas antes ou durante a exposição, uma vez que os equipamentos de exposição – como os *buffets*, muitas vezes não mantêm temperaturas de refrigeração adequadas. Em vista disso, comumente há alimentos sendo distribuídos em temperaturas de abuso, porém, na maioria das vezes, isso não resulta em surto alimentar, levantando dúvidas sobre as razões desses fatos.

Informações sobre a capacidade e taxa de multiplicação dos micro-organismos nos alimentos, bem como a compreensão sobre sua fisiologia são fatores de grande importância, podendo contribuir na prevenção de doenças e surtos alimentares (BUCHANAN, 1997; McMEEKIN; ROSS, 1996). A relação tempo-temperatura para cada micro-organismo é específica e dependente das características do alimento em que está inserido (USAJEWICZ; NALEPA, 2006). A microbiologia preditiva permite

predizer a resposta da multiplicação de micro-organismos frente a variações de fatores como temperatura, condições de armazenamento, umidade e pH. Ela surgiu como um elemento essencial à microbiologia de alimentos, favorecendo a qualidade e a segurança dos alimentos e permitindo analisar riscos, vida de prateleira, desenvolver novos produtos e processos, contribuindo para tomadas de decisão (OLIVEIRA et al., 2013).

*Escherichia coli* é um micro-organismo Gram-negativo considerado indicador de contaminação fecal (MADAPPA, 2016; LAMBRECHTS et al., 2014). Já *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva frequentemente encontrada em humanos (HO et al., 2015). Ambos micro-organismos estão entre os maiores envolvidos em surtos no Brasil, especialmente em serviços de alimentação (BRASIL, 2016) e são ótimos indicadores da contaminação de alimentos. As frutas e verduras estão entre os alimentos mais consumidos em *buffets* e, frequentemente, não são distribuídos nas temperaturas de refrigeração preconizadas pela legislação brasileira. A avaliação do desenvolvimento de micro-organismos em frutas e vegetais expostos a diferentes temperaturas podem trazer informações importantes para a distribuição segura desses alimentos em serviços de alimentação. Assim, foi realizado no presente estudo, a investigação da multiplicação de dois micro-organismos indicadores, um Gram-negativo e outro Gram-positivo, em frutas e verduras frequentemente consumidas em serviços de alimentação.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em frutas e vegetais expostos a 10, 20 e 30 °C, bem como realizar a modelagem da multiplicação destes micro-organismos nos alimentos de maior risco.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Identificar frutas e vegetais frequentemente consumidos em restaurantes comerciais de Porto Alegre.
- ✓ Avaliar a multiplicação de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* nas frutas e vegetais mais frequentemente encontrados nos restaurantes comerciais avaliados, expostos a 10, 20 e 30 °C;
- ✓ Identificar os vegetais que mais propiciam o desenvolvimento de *E. coli* e *S. aureus*, a fim de determinar parâmetros cinéticos de multiplicação (tempo de fase *lag*, taxa de multiplicação e população máxima) em função da temperatura, através de modelos primários e secundários;
- ✓ Comparar os modelos de multiplicação obtidos neste estudo com o modelo do Programa *ComBase Predictive Model*.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Dados sobre o consumo de alimentos fora do domicílio**

É notável o aumento da frequência e do hábito das pessoas se alimentarem fora do domicílio, decorrente das constantes mudanças profissionais, culturais e econômicas que vem ocorrendo devido à globalização. A preocupação da população e dos serviços de alimentação com a qualidade dos alimentos é crescente, porém a maioria dos consumidores não possui informações suficientes para avaliar e reivindicar melhorias (LIU et al., 2015; BEZERRA et al., 2015).

Dados da última Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) demonstraram um aumento no percentual das despesas com alimentação fora de casa, totalizando em 33,1% do gasto médio mensal familiar na área urbana. O maior percentual com alimentação fora do domicílio ocorreu na Região Sudeste (37,2%), enquanto o menor percentual ocorreu na Região Norte (21,4%). Na região Sul, o gasto médio com alimentação fora de casa foi de 27,7% (IBGE, 2010).

Nos Estados Unidos, o consumo de alimentos preparados fora de casa também desempenha um papel cada vez mais importante na economia do país. Em 2012, os gastos com comida em refeições fora de casa atingiu 43,1%. Uma série de fatores contribuiu para esse aumento, como maior número de mulheres empregadas fora de casa, rendimentos familiares mais elevados, *fast-food* mais acessíveis e convenientes, aumento da divulgação dos serviços de alimentação e o menor tamanho das famílias americanas (USDA, 2014). Segundo Liu et al. (2015), da mesma maneira, na China está havendo um crescimento nas despesas com o consumo de alimentos fora de casa devido ao aumento da renda familiar.

A qualidade dos serviços de alimentação oferecidos para trabalhadores e estudantes é essencial para que os mesmos tenham acesso à segurança dos alimentos. O mercado que supre a demanda por alimentação fora do domicílio tem uma participação significativa e crescente no setor alimentício e na geração de empregos diretos e indiretos, principalmente nos grandes centros urbanos e, portanto, demanda atenção redobrada dos diversos segmentos da sociedade (LEAL, 2010).

Dentre as opções para alimentação fora de casa estão os restaurantes *self-services*, que foram criados com a finalidade de atender principalmente a classe de trabalhadores que moram distante do seu local de trabalho (LEAL, 2010; RODRIGUES; ARAÚJO,

2004). No Brasil, o restaurante *self-service* é do estilo *buffet* por quilo, onde uma grande variedade de pratos está disponível para os clientes que se servem de um *buffet*, criando a sua própria refeição. Em seguida, o prato de comida é pesado em uma balança e os consumidores pagam o valor correspondente. Estes restaurantes surgiram para atender a crescente necessidade de refeições mais rápidas e mais variadas (BERNARDO et al., 2015). Esse panorama alimentar, por um lado, ajuda e facilita a vida das pessoas, por outro, causa certo receio por parte do consumidor no que diz respeito à segurança dos alimentos servidos (ALVES; UENO, 2010).

### **3.2 Consumo e contaminação de frutas e vegetais**

O consumo de frutas e vegetais frescos tem aumentado nos últimos anos e estima-se um crescimento de 8-9% nos próximos 5 anos, em todo o mundo (PBH, 2015). Apesar disso e das recomendações de saúde pública para aumentar o consumo de frutas e vegetais, as ingestões desses alimentos são inferiores aos níveis recomendados. Conseguir um aumento sustentado na ingestão de frutas e vegetais é um desafio que exigirá novas abordagens de intervenção (WOODSIDE et al., 2013; MILLER et al., 2015).

No entanto, Leff & Fierer (2013) afirmam que frutas e vegetais podem abrigar grandes e diversas populações de bactérias e que esta quantidade é, muitas vezes, impulsionada por más práticas agrícolas. A contaminação de frutas e vegetais frescos é de especial preocupação, pois, normalmente, estes produtos são consumidos crus, sem qualquer tipo de processamento microbiologicamente letal, gerando assim um potencial problema na segurança desses alimentos (CARRASCO et al., 2012; ZWEIFEL & STEPHAN, 2012). Métodos seguros de produção, distribuição e procedimentos de descontaminação são, portanto, passos essenciais para garantir o consumo seguro de frutas e vegetais (BHARATHI et al., 2001; ARTÉS et al., 2009). Assim, para evitar a contaminação e multiplicação de bactérias, indústrias e legislações adotam parâmetros para higienização de frutas e vegetais e de manipulação de alimentos em temperaturas seguras.

### **3.3 Legislação**

De acordo com a Portaria 78/2009, do Rio Grande do Sul, os procedimentos de higienização dos alimentos hortifrutigranjeiros devem seguir os seguintes critérios:

- I. Seleção dos alimentos, retirando partes ou produtos deteriorados e sem condições adequadas;
- II. Lavagem criteriosa dos alimentos um a um, com água potável;
- III. Desinfecção: imersão em solução clorada com 100 a 250 ppm de cloro livre, por 15 minutos, ou demais produtos adequados, registrados no Ministério da Saúde, liberados para esse fim e de acordo com as indicações do fabricante;
- IV. Enxágue com água potável

Já para a preparação, armazenamento e distribuição dos alimentos, a legislação brasileira e a Portaria do Estado do Rio Grande do Sul determinam que os alimentos refrigerados devem ser mantidos em temperaturas inferiores a 5 °C (BRASIL, 2004; RIO GRANDE DO SUL, 2009). Além disso, alimentos submetidos a um processo de cocção devem ser previamente resfriados antes da estocagem. Esse processo de resfriamento de um alimento preparado deve ser realizado de forma a minimizar o risco de contaminação cruzada e a permanência do mesmo em temperaturas que favoreçam a multiplicação microbiana. A temperatura do alimento preparado deve ser reduzida de 60 °C a 10 °C em até 2 horas e, somente então armazenado abaixo de 5 °C (BRASIL, 2004; RIO GRANDE DO SUL, 2009; SÃO PAULO, 2013).

Entretanto, a legislação de São Paulo - Portaria CVS 5, 2013 - é mais flexível em seus parâmetros. Os alimentos expostos para o consumo imediato devem obedecer aos critérios de tempos e temperaturas apresentados na Tabela 1. Os alimentos que não observarem esses critérios devem ser desprezados.

Tabela 1. Critérios de tempos e temperaturas para alimentos expostos para o consumo imediato

	Temperatura em °C (no centro geométrico)	Tempo de exposição (horas)
Alimentos frios	Até 10	máximo 4
	entre 10 e 21	máximo 2

Fonte: São Paulo (2013)

O emprego inadequado da temperatura no processo produtivo – conservação em temperatura ambiente e refrigeração inadequada – é um dos principais fatores determinantes da sobrevivência e multiplicação de micro-organismos, o que pode resultar na ocorrência de surtos alimentares (WHO, 2006).

### **3.4 Doenças Transmissíveis por Alimentos**

Doenças transmitidas por alimentos, comumente conhecidas como DTA, são causadas pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminados. Existem mais de 250 tipos de DTA e a maioria apresenta-se como uma infecção ou intoxicação causada por bactérias e/ou suas toxinas, vírus e parasitas (BRASIL, 2014). Um surto de DTA é caracterizado pelo aparecimento de doença semelhante em duas ou mais pessoas, após ingerirem alimentos de origem comum (CDC, 2000). Para aqueles micro-organismos com severidades mais altas, como *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*, basta um caso para ser considerado um surto. Os sintomas mais comuns incluem dor de estômago, náusea, vômitos, diarreia e febre. Pode ocorrer uma variação na intensidade dos sintomas, uma vez que pessoas têm suscetibilidades diferentes frente a agentes infecciosos; a quantidade do micro-organismo ingerido é diferente de pessoa para pessoa, pois sua distribuição no alimento não é homogênea; e a refeição pode ser feita em horários diferentes (TONDO; BARTZ, 2014).

As DTA podem levar à hospitalização, existindo a possibilidade de ocorrerem sintomas que não permitam o paciente a ter sua funcionalidade restaurada ou haver o risco de morte, de modo especial em pacientes idosos e imunodeprimidos. Por isso, há uma considerável preocupação dos setores de saúde pública relacionada a estas infecções (FORSYTHE, 2013).

De acordo com dados do Ministério da Saúde do Brasil, durante o período entre 2007 e 2016, ocorreram 6632 surtos de DTA. No entanto, há uma imensa dificuldade de obter informações sobre os surtos, agentes etiológicos causadores, alimento consumido e local de ocorrência. Conforme dados da Vigilância Epidemiológica das DTA, no Brasil, em torno de 70,3% desses surtos não obtiveram o agente etiológico identificado. Dentro os micro-organismos, *Salmonella* spp. foi identificada como o principal agente causador de doenças transmitidas por alimentos (7,5%), seguido por *Escherichia coli* (7,2%), *Staphylococcus aureus* (5,8%) e *Bacillus cereus* (2,6%).

Visto que muitas pessoas não estão conscientes de que possam existir riscos potenciais com a ingestão de alimentos, quantidades significativas de produtos contaminados são ingeridas, levando os consumidores a ficarem doentes. Desse modo, é difícil saber qual alimento foi a causa original da toxinfecção alimentar, uma vez que o consumidor pode não lembrar de suas últimas refeições. Em geral, os consumidores

lemboram somente de alimentos que apresentaram odor ou coloração diferente; entretanto, tais características estão ligadas à deterioração dos alimentos e não a toxinfecções alimentares (FORSYTHE, 2013). Como as DTA podem ter várias causas, não há um quadro clínico específico. Os sinais dependem de cada tipo de patógeno e muitos deles produzem os mesmos sintomas, o que dificulta o diagnóstico clínico. O período de incubação varia conforme o agente etiológico, porém usualmente é curto, variando de 1 a 7 dias. O tratamento das DTA depende da sintomatologia, mas em geral, trata-se de doença autolimitada, sendo assim o tratamento é baseado em medidas de suporte para evitar a desidratação e o óbito (BRASIL, 2014). No período de 2000 a 2016, em torno de 66,8% dos surtos analisados não foram identificados os alimentos causadores das doenças transmitidas por alimentos no Brasil. As fontes mais comuns foram: alimentos mistos (9,0%), água (6,0%), ovos e produtos à base de ovo (3,6%), leite e derivados (2,6%), doces e sobremesas (2,1%), carne bovina *in natura*, processada e moída (2,1%); enquanto que hortaliças, frutas e similares correspondem a 1,1% dos alimentos incriminados nos surtos analisados.

Residências particulares foram os locais mais frequentemente associados com a ocorrência de surtos – com 38,9 % dos casos relatados até junho de 2016 – seguidas dos serviços de alimentação (padarias e restaurantes) com 16,2 % (BRASIL, 2016).

Portanto, o alimento produzido tanto em residências particulares como em serviços de alimentação pode ser um importante elo na cadeia epidemiológica de doenças transmissíveis. A conservação de alimentos em condições inadequadas favorece a multiplicação de micro-organismos que podem resultar em toxo-infecções (MULLER, 2011), sendo fundamental a implementação das boas práticas visando evitar as DTA.

### **3.5 Boas Práticas**

Boas práticas são uma das principais ferramentas que gerenciam e proporcionam a segurança dos alimentos. São práticas de higiene que devem ser obedecidas pelos manipuladores, desde a escolha e compra das matérias-primas a serem utilizadas no preparo do alimento até a venda para o consumidor. O objetivo é reduzir ao máximo as fontes de contaminação, evitando a ocorrência de doenças provocadas pelo consumo de alimentos contaminados (ANVISA, 2008; TONDO; BARTZ, 2014).

Para verificar se a implementação das boas práticas está sendo eficaz, a legislação do Rio Grande do Sul indica a aplicação de uma lista de verificação, a fim de garantir

adequadas condições higiênico-sanitárias nos alimentos preparados. Os resultados permitem identificar pontos de não conformidade e a partir disto traçar ações corretivas (RIO GRANDE DO SUL, 2009).

A qualidade higiênico-sanitária e a redução dos riscos de contaminação estão diretamente ligadas à aplicação das Boas Práticas (SANI; SIOW, 2014; HERRERA et al., 2014). Além disso, entender o comportamento dos micro-organismos frente a diferentes condições ambientais é fundamental para manter e/ou melhorar a segurança dos alimentos.

### 3.6 Comportamento dos micro-organismos

O estudo sobre o impacto dos micro-organismos na segurança e qualidade dos alimentos pode ser avaliado através da construção de curvas microbianas, que podem ser classificadas como de multiplicação, de inativação ou de sobrevivência. Os modelos de multiplicação descrevem um aumento de população ao longo do tempo. Modelos de inativação descrevem um decréscimo ao longo do tempo resultante da aplicação de algum tipo de tratamento letal, como calor ou radiação. Modelos de sobrevivência descrevem uma diminuição ao longo do tempo ou probabilidade de sobrevivência, ao longo do tempo, quando as condições ambientais não são nem claramente letais nem de multiplicação (McKELLAR et al., 2002; YU et al., 2006).

A curva de multiplicação típica pode ser construída quando o crescimento bacteriano de um determinado micro-organismo ocorre em um sistema fechado. Esta curva é dividida em quatro fases: *lag*, exponencial (*log*), estacionária e de declínio ou morte, como apresentado na Figura 1 (ROSS; McMEEKIN, 2003; MARKS, 2008).

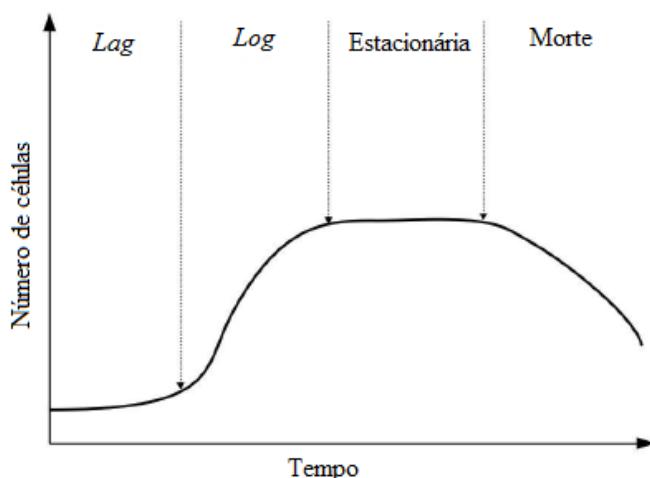


Figura 1. Curva típica de multiplicação bacteriana. Fonte: Ross & McMeekin (2003).

O comportamento dos micro-organismos nos alimentos é determinado pelas propriedades intrínsecas e extrínsecas. Os fatores intrínsecos englobam atividade de água ( $a_w$ ), pH e microbiota do alimento. Já os fatores extrínsecos são dados pelas condições de estocagem do produto como temperatura, umidade relativa e presença de composição de gases (NAKASHIMA et al., 2000).

Informações sobre a capacidade e multiplicação microbiana em alimentos e uma melhor compreensão sobre sua fisiologia são fatores de grande importância, favorecendo a tomada de decisões na prevenção de doenças e surtos alimentares (BUCHANAN, 1997; McMEEKIN; ROSS, 1996). A relação tempo-temperatura para cada micro-organismo é específica e dependente das características do meio em que está inserido (USAJEWICZ; NALEPA, 2006).

Alguns patógenos causam doença quando o alimento é intrinsecamente contaminado ou por contaminação cruzada durante a produção, processamento ou transporte. Além disso, os alimentos podem ser contaminados quando preparados por manipuladores infectados ou sem as boas práticas de higiene mínimas necessárias para produzir um alimento. Os patógenos bacterianos também podem causar doença quando bactérias se multiplicam nos alimentos depois de terem sido mantidos a temperaturas abusivas que permitam a sua multiplicação (CDC, 2014).

### **3.7 Microbiologia Preditiva**

A microbiologia preditiva permite predizer a resposta da multiplicação do micro-organismo frente a variações de fatores como temperatura, condições de armazenamento, umidade e pH. Ela surgiu como um elemento essencial à microbiologia de alimentos, favorecendo a qualidade e a segurança dos alimentos e permitindo analisar riscos, avaliar a vida de prateleira, desenvolver novos produtos e processos, aliando ações na tomada de decisão (OLIVEIRA et al., 2013). O comportamento dos micro-organismos (inativação, multiplicação e sobrevivência) é descrito mediante uma condição ambiental, como temperatura, através de modelos matemáticos (HABERBECK, 2011). Whiting & Buchanan (1993) classificaram estes modelos matemáticos como: modelos primários e modelos secundários.

Os modelos primários correspondem a modelos matemáticos que descrevem a multiplicação ou as respostas microbianas em função do tempo sob determinadas

condições ambientais ou de cultivo. Para este modelo, é utilizado os seguintes parâmetros: número inicial de células, taxa de multiplicação, tempo de fase *lag* e densidade populacional máxima (WHITING, 1995; McDONALD; SUN, 1999; McMEEKIN et al., 2002; KAJAK; KRAJEWSKA, 2006).

Já os modelos secundários descrevem a variação dos parâmetros cinéticos em função da variação de uma condição ambiental (WHITING, 1995; McDONALD; SUN, 1999; NAKASHIMA et al., 2000; McMEEKIN et al., 2002; MARKS, 2008). Os modelos que avaliam a variação de temperatura são os mais utilizados, dentre eles o modelo da raiz quadrada, também conhecido como modelo de Ratkowsky (RATKOWSKY, 1982), se destaca (WHITING; BUCHAN, 1993).

Por fim, alguns autores citam também os modelos terciários, que são constituídos por softwares que combinam o uso de modelos primários e secundários. Estes programas podem calcular respostas microbianas em diferentes condições, comparar o efeito destas variações ou ainda contrastar o comportamento de vários micro-organismos. Estes aplicativos facilitam a modelagem das curvas de multiplicação e inativação microbiana sob diferentes condições (WHITING, 1995; McDONALD; SUN, 1999; McMEEKIN et al., 2002; KAJAK; KRAJEWSKA, 2006).

Os modelos são baseados no estudo do comportamento da população microbiana, multiplicação ou velocidade de multiplicação de micro-organismos de interesse, em função do tempo. Assim, para aplicação dos modelos preditivos, foram selecionados micro-organismos de interesse para esta pesquisa.

### **3.8 Micro-organismos de interesse na pesquisa**

No Brasil - entre 2007 e 2016 - foram notificados 478 surtos envolvendo *Escherichia coli* e 385 envolvendo *Staphylococcus aureus*, sendo estes, respectivamente, o segundo e o terceiro principais agentes causadores de surtos de DTA, no Brasil (BRASIL, 2016). *E. coli* é um micro-organismo Gram-negativo considerado indicador de contaminação fecal (MADAPPA, 2016; LAMBRESCHTS et al., 2014) e *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, frequentemente encontrada em humanos (HO et al., 2015). No presente estudo, esses micro-organismos foram escolhidos para serem inoculados sobre vegetais por serem representantes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, serem causadores de surtos alimentares e terem sido encontrados em frutas e vegetais ao redor do mundo. Por exemplo, Al-Kharousi et al.

(2016) isolaram *E. coli* e *S. aureus* de 22% e 7% de vegetais analisados (n=45) em Omã (país árabe), respectivamente; foi encontrado *S. aureus* em amostras de radicche e *E. coli* em amostras de radicche, alface e repolho. Na Argentina, Estrada et al. (2014) analisaram a qualidade microbiológica das saladas de frutas artesanais (n=71) e encontraram 11 isolados de *S. aureus* (7,81%). Já nos Estados Unidos, Laidler et al. (2013) encontraram 10 amostras de morangos (9%) contaminados com *E. coli* O157 (n = 111). No Paquistão, um total de 260 amostras de vegetais e saladas (pepino, alface, espinafre e cenoura) foram coletadas de mercados e cerca de 34% de amostras estavam contaminadas com *E. coli* (SHAH et al., 2015).

### **3.8.1 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus* é o agente responsável por aproximadamente 45% das intoxicações alimentares no mundo (STAMFORD et al., 2006). A contaminação dos alimentos ou matérias primas podem ocorrer durante a produção ou estocagem, por cepas de origem ambiental ou humana. Em condições favoráveis de temperatura, o micro-organismo se multiplica, podendo produzir toxinas. O controle é possível desde que se observem as boas práticas de fabricação nos estágios de obtenção, produção, estocagem e manuseio de alimentos, além da temperatura (STAMFORD et al., 2006).

*Staphylococcus aureus* é o principal agente etiológico associado à intoxicação alimentar estafilocócica. São bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas e possuem formato esférico, arranjados em formato de cachos de uva. Podem ser encontradas no ar, na poeira, no esgoto, na água, em alimentos, equipamentos, superfícies e, principalmente, nos seres humanos e nos animais (FORSYTHE, 2013; FDA, 2012). Estima-se que 20 a 60% dos humanos (HO et al., 2015) possam ser portadores assintomáticos da bactéria, acarretando risco quando manipulam alimentos, pois podem contaminá-los durante as diferentes fases de preparação pelas mãos, ouvido, boca e secreções nasais. Já os portadores com feridas abertas, principalmente nas mãos, devem evitar manipular alimentos (GERMANO; GERMANO, 2011). *S. aureus* podem produzir toxinas que não são destruídas pelo tratamento térmico convencional de cozimento, embora a própria bactéria possa ser inativada pelo calor (FDA, 2012).

As intoxicações alimentares são causadas pela ingestão da enterotoxina produzida no alimento por algumas cepas de *S. aureus*, em geral porque o alimento não foi mantido nas temperaturas adequadas (FORSYTHE, 2013; FETSCH et al., 2014). A

dose tóxica mínima da enterotoxina capaz de provocar a manifestação clínica da intoxicação estafilocócica é inferior a 1 micrograma. Esse nível de toxina é alcançado quando o número de células bacterianas, contaminantes de um alimento, ultrapassa 100.000 por grama (GERMANO; GERMANO, 2011). No estudo realizado por Rapini et al. (2005), de um total de 45 *pools* de espécies de *Staphylococcus* isolados de diferentes sítios de manipuladores, 62,2% destes apresentaram produção de enterotoxina. Já Dabool & Al-Ghamdi (2011), isolaram 129 cepas de *S. aureus* de manipuladores de alimentos (n=1516), dentro das quais, 35% foram produtores de enterotoxinas estafilocócicas.

A transmissão das intoxicações causadas pelo *S. aureus* ocorre pela ingestão de alimentos inicialmente contaminados com a bactéria, submetidos a temperaturas abusivas de refrigeração para conservação. Nestas condições há multiplicação bacteriana e consequente produção de enterotoxina (GERMANO; GERMANO, 2011). Sintomas de intoxicação por *Staphylococcus* aparecem com rapidez – 1 a 7 horas após a ingestão – e incluem náuseas, vômitos, cólicas abdominais com ou sem diarreia. Esta manifestação pode variar de intensidade, dependendo da sensibilidade individual à toxina, da quantidade de alimento contaminado ingerido, da quantidade de toxina no alimento ingerido e da saúde geral do indivíduo. Nos casos mais graves podem ocorrer dores de cabeça, cãibras musculares e mudanças rápidas na pressão arterial bem como na taxa de pulsação. A doença é normalmente autolimitada e em geral dura de 1 a 3 dias (FORSYTHE, 2013; TONDO; BARTZ, 2014).

A multiplicação de *S. aureus* ocorre em temperatura de 7 a 47,8 °C, sendo 35 °C a temperatura ideal. As medidas de controle utilizadas para reduzir a carga microbiana dos alimentos são a higienização das mãos ao manusear alimentos, a limpeza correta dos equipamentos, utensílios e superfícies de manipulação, a fim de evitar a contaminação cruzada e manter os alimentos refrigerados a 5 °C ou abaixo (FORSYTHE, 2013; FDA, 2012).

### **3.8.2 *Escherichia coli***

*Escherichia* é um gênero que engloba micro-organismos em forma de bastonetes, Gram-negativos, que existem isoladamente ou em pares e são anaeróbios facultativos (MADAPPA, 2016). A *E. coli* é a principal espécie no grupo dos coliformes fecais, considerada aquela que melhor indica contaminação fecal e a possível presença de

patógenos entéricos entre as bactérias coliformes. É uma bactéria não formadora de esporos encontrada normalmente nos intestinos dos animais e do homem. Representa 80% da microbiota intestinal aeróbia, sendo eliminada nas fezes, o que propicia a contaminação do solo e das águas (FORSYTHE, 2013; LAMBRECHTS et al., 2014).

A incidência de infecções por *E. coli* é maior nas regiões tropicais, onde predominam grandes aglomerações populacionais e condições sanitárias precárias. As principais vias de transmissão são os alimentos tanto de origem animal como de vegetal, principalmente quando consumidos crus ou insuficientemente cozidos, além da água de abastecimento não tratada. Qualquer alimento exposto a contaminação fecal, seja por meio da água de preparo ou dos manipuladores infectados, é capaz de veicular a *E. coli*. A prevenção e o controle passam obrigatoriamente pela conservação das matérias-primas abaixo de 5 °C, pela adoção de boas práticas, pelos cuidados na manipulação de alimentos, pela higiene de instalações e equipamentos e pelo tratamento térmico adequado (GERMANO; GERMANO, 2011; RIO GRANDE DO SUL, 2009).

As *E. coli* são classificadas de acordo com os seus fatores de virulência específicos, que lhe conferem uma maior resistência a novos ambientes. Grupos patogênicos incluem *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvadiva (EIEC), enteroaggregativa (EAEC), produtora de toxina Shiga (STEC), difusamente aderente (DAEC), entre outros que ainda não foram bem caracterizadas (FENG et al., 2011).

Shah et al. (2015) avaliaram a prevalência de *E. coli* enterotoxigênica, enteropatogênica e produtora de toxina Shiga em vegetais crus e saladas prontas para consumo. Um total de 260 vegetais (pepino, alface, espinafre e cenoura) foram coletados de mercados de alimentos comerciais no Paquistão. Destas amostras, 8,5% apresentaram *E. coli* patogênicas; sendo a maioria delas ETEC (5,8%), seguida da EPEC.

Portanto, avaliar o comportamento de *S. aureus* e *E. coli* em frutas e vegetais expostos a diferentes temperaturas pode trazer informações importantes para a distribuição segura desses alimentos em serviços de alimentação.

## **4 RESULTADOS**

Este capítulo aborda os materiais e métodos utilizados, os resultados e discussões obtidos na dissertação. Tais informações são apresentadas na forma de três artigos científicos e cada subtítulo desse capítulo corresponde a um destes artigos.

Na seção 4.1 é apresentado o estudo que avaliou a multiplicação de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em frutas e vegetais expostos a 10, 20 e 30 °C. Já na seção 4.2 é apresentado o estudo da modelagem preditiva de *E. coli* no tomate e simulação das temperaturas encontradas em planilhas de serviços de alimentação no Brasil. Por fim, na seção 4.3 é apresentado o artigo da modelagem preditiva de *S. aureus* em brócolis.

## **4.1 Artigo Científico 1**

### **Assessing the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* on fruits and vegetables exposed at 10, 20 and 30 °C**

Caroline Isabel Kothe, João Pedro Pessoa, Susana de Oliveira Elias, Patrícia da Silva  
Malheiros, Eduardo Cesar Tondo

Artigo científico submetido ao periódico *Food Control*

#### **Abstract**

This study aimed to assess the growth of two bacterial indicators, one Gram- positive and other Gram-negative, on fruits and vegetables exposed to different temperatures, simulating the reality of distribution step found in food services. Commercial restaurants ( $n=50$ ) were visited in order to identify the most frequent fruits and vegetables served on buffet. Grated carrot, broccoli, cucumber, green cabbage, tomato, watermelon and papaya were the main identified foods. These foods were artificially contaminated with a pool of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, separately, and then exposed at 10, 20 and 30 °C, assumed as abuse temperatures found in distribution food services. There was no growth of *S. aureus* and *E. coli* on all evaluated foods exposed at 10 °C for 6 h and at 20 °C, *S. aureus* was able to multiply only after 24 h on broccoli, cucumber, watermelon and papaya. Broccoli had the highest growth potential for *S. aureus* at 20 °C and 30 °C ( $\alpha = 4.38$  and  $\alpha = 5.68$ , respectively), probably because this was the only cooked vegetable evaluated. *E. coli* was able to grow after 4 h at 20 °C on papaya, cucumber, watermelon and broccoli. The same microorganism presented significant ( $p < 0.05$ ) grow after 2 h on the same fruits and vegetables, at 30 °C. Therefore, it is suggested that fruits and vegetables should be distributed under refrigeration temperatures (at least  $< 10$  °C) and should not be kept for more than 2 hours at room temperature.

**Keywords:** indicator microorganisms; growth curve, distribution temperature, distribution time.

## Highlights

- *S. aureus* and *E. coli* were not able to grow on fruits and vegetables at 10 °C for 6h.
- *S. aureus* had the highest growth potential on cooked broccoli at 20 °C and 30 °C.
- *E. coli* was able to growth after 2 h at 30 °C on some fruits and vegetables.
- Fruits and vegetables should not be kept for more than 2 h without adequate refrigeration.

### **1. Introduction**

The consumption of fresh fruits and vegetables has increased during the last few years and it is expected to increase 8-9 % over the next 5 years worldwide (PBH, 2015). At the same time that the consumption increases, the number of registered foodborne diseases involving fresh produce is raising in many countries, as well in Brazil (Brasil, 2016; EFSA, 2013).

In Brazil, according to the official records on foodborne diseases, from 2000 to 2016, food services were the second most frequent establishments involved with foodborne outbreaks, losing only to private residences, where the Sanitary Surveillance Services has no access. Among the main etiological agent involved with these outbreaks are *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (Brasil, 2016). *E. coli* is a Gram-negative bacterium considered an indicator of fecal contamination (Lambreschts et al., 2014), while *S. aureus* is a Gram-positive microorganism often found on humans (Ho et al., 2015). Both microorganisms are frequently used as indicators of hygienic and sanitary conditions of foods and food handlers (Ho et al., 2015; Lambreschts et al., 2014). Besides that, *E. coli* and *S. aureus* have been found on fruits and salads, such as strawberries, fruit salads, radish, cabbage, lettuce, cucumber, carrot, spinach and sprouts (Haris et al., 2003; Seo et al., 2010; Laidler et al., 2013; Estrada et al., 2014; Shah et al., 2015; Hong et al., 2015; Al-Kharousi et al., 2016).

The inadequate temperature during food preparation, i.e., storage at improper temperatures and poor control of cold chain are some of the main reasons for the survival and multiplication of microorganisms, which may result in Foodborne Diseases (FBD) outbreaks. The lack of control over the time-temperature binomial in the preparation of foods is too one of the major contributing factors for FBD (Cunha et al., 2014; Oliveira et al., 2014).

Brazilian food service's legislation (Brasil, 2004; Rio Grande do Sul, 2009) follows the World Health Organization (WHO) recommendations and temperature is one of the main factors to be controlled in order to prevent FBD. In Brazil, very often foods are distributed on buffets, without appropriate cool temperature ( $<5$  °C) and temperature abuse is one of the most frequent nonconformities found in Brazilian food services. According the Brazilian legislation, the limit period of time to food distribution in food services is 6 h (Brasil, 2004; Rio Grande do Sul, 2009). Inadequate distribution temperatures ( $>5$  °C) are especially common when fruits and vegetables are distributed on buffets of food services. However, FBD outbreaks involving these kind of foods are rare (Brasil, 2016), raising doubts about the growth of microorganisms on fruits and vegetables exposed to temperatures higher than 5 °C.

Thus, the aim of this study was to assess the growth of *S. aureus* and *E. coli* on fruits and vegetables exposed to 10, 20 and 30 °C, in order to the best understanding of what can happens during fruits and vegetables distribution in food services without proper temperature control.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Commercial restaurants data

A questionnaire composed by three open questions was used in order to indentify the most frequent fruits and vegetables served in 50 commercial restaurants, of Porto Alegre city, Southern Brazil. The questionnaire was composed by questions regarding the number of daily meals, which were the fruits and vegetables most frequently served at buffets and how many times per week these foods were served /distributed. After the questionnaire application, the data were grouped, ordained, transferred to a database (Excel) and a descriptive statistical analysis was carried out, identifying frequency, means and standard deviations of each fruit and vegetable served/distributed on buffets.

### 2.2 Bacterial cultures

Five strains of *S. aureus* and five strains of *E. coli* were selected based on available diversity in order to compose two bacterial pools, which were artificially inoculated on the fruits and vegetables, separately. The strains used were: *S. aureus* 4668/03 (isolated from a FBD outbreak occurred in Southern Brazil), *S. aureus* S6

(isolated from a stainless steel surface of a poultry slaughterhouse, before cleaning and disinfection), *S. aureus* S8 (isolated from a cutting board of a poultry slaughterhouse, before cleaning and disinfection), *S. aureus* ATCC 2998 and *S. aureus* ATCC 25923 (acquired from Culture Collection stock of Laboratory of Food Control and Food Microbiology of ICTA/UFRGS). The strains of *E. coli* were *E. coli* CQ (isolated from a hot dog commercialized by a food service of Southern Brazil), *E. coli* ECHC (isolated from human cystitis), *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* ATCC 8739 and *E. coli* ATCC 25922 (acquired from Culture Collection stock of Laboratory of Food Control and Food Microbiology of ICTA/UFRGS).

### *2.3 Inoculum preparation*

Each strain of *S. aureus* and *E. coli* was grown in 5 mL of Brain Heart Infusion broth (BHI, HiMedia), at 37 °C, for 18-24 h. After incubation, 2 mL of each strain of *S. aureus* and *E. coli* were mixed in a sterile tube, separately. Next, each bacterial pool was centrifuged for 5 min at 14000 rpm, the supernatants were discharged and the pellets were washed with 0.1% peptone water. This procedure was repeated two times and, in the second repetition, cells were re-suspended in 0.1% peptone water and the final cell concentration was adjusted through optical density 0.5 (OD<sub>630nm</sub>) and plate count at 10<sup>8</sup> CFU/mL. Decimal serial dilutions using 0.1% peptone water were prepared and the pools were separately inoculated, reaching final concentrations on fruits and vegetables of approximately 1000 CFU/g (3 log CFU/g).

### *2.4 Inoculation and preparation of vegetables and fruits*

All fruits and vegetables were acquired from a supermarket in Porto Alegre city, Brazil. Each food was submitted to different treatments and processing at Laboratory of Food Control and Food Microbiology of ICTA/UFRGS (Table 1).

After the proceedings described on Table 1, the samples were subjected to analysis of pH using a benchtop pHmeter (Model Q400A, Quimis, Brazil) and water activity ( $a_w$ ) using an AquaLab water activity meter (Model 3TE, Decagon Devices, USA) (Table 2).

The preparations were divided in portions of 10 g and were put inside sterile plastic bags. Each fruit and vegetable were contaminated with 1 ml of each bacterial pool, separately (final concentration: 3 log UFC/g). Subsequently, samples were

incubated at different temperatures simulating the following scenarios: refrigeration using inadequate temperature i.e 10 °C (assuming that Brazilian regulation establish <5 °C as proper temperatures for ready to eat food distribution), distribution at room temperature (20 °C) and distribution at room temperature during a Brazilian summer day (30 °C). Samples were taken at 0 h, 2 h, 4 h, 6 h - simulating the maximum time exposure of these foods on a buffet (Brasil, 2004) - and 24 h, considering inadequate reuse of foods from buffet. In order to evaluate microbial contamination of fruits and vegetables, 10 g of each food was homogenized in 90 mL of 0.1% peptone water (HiMedia) in a stomacher plastic bag, followed by decimal dilution using the same diluent. *S. aureus* counts were carried out using Baird-Park Agar (BP, Oxoid), *E. coli* counts were done using Violet Red Bile Agar (VRB, Merck) and mesophilic microorganisms were quantified on plates of Brain Heart Infusion Agar (BHI, HiMedia). The microorganisms were quantified by drop method (Miles & Misra, 1938) with a detection limit of 1.69 log CFU/g (50 CFU/g) after incubation at 37 °C for 18-24 h. Uninoculated controls were included to verify initial microbial quality of fruits and vegetables used. These foods were investigated for *S. aureus* and *E. coli* contamination. Experiments were performed at least in duplicate with three repetitions and the results were expressed as log CFU/g.

#### *2.4 Determination of growth potential ( $\alpha$ )*

The growth potential ( $\alpha$ ) of *S. aureus* and *E. coli* on each fruit and vegetable was estimated by calculating the log difference between the counts at 24 h and at time 0. *S. aureus* and *E. coli* were considered not able to grow on the foods when  $\alpha$  value was negative or lower than 0.5 log (Sant'Ana et al., 2013).

#### *2.6 Statistical Analyses*

The growth of *S. aureus* in all fruits and vegetables was analyzed statistically by analysis of variance (ANOVA) applying the Tukey test ( $p < 0.05$ ). The software used was Statistica 13.0.

### **3 Results and discussion**

#### *3.1 Commercial restaurants evaluation*

Among the restaurants visited, 34.0% serving up to 150 daily meals, 38.3% between 150 and 300 and 27.7% more than 300 daily meals. Considering the maximum attendance of 5 days per week, the frequency of distribution of fruits and vegetables evaluated was on average 4 days per week. The fruits and vegetables more often exposed at the buffet are tomato ( $4.91\pm0.41$  days), papaya ( $4.67\pm0.88$  days), grated carrot ( $4.31\pm1.16$  days), watermelon ( $4.21\pm1.32$  days), cooked broccoli ( $4.06\pm1.20$  days), green cabbage ( $3.96\pm1.33$  days) and cucumber ( $3.61\pm1.45$  days). For this reason, these foods were chosen for this study.

### *3.2 Growth of *S. aureus*, *E. coli* and mesophilic microorganisms on fruits and vegetables at 10 °C, 20 °C and 30 °C*

Despite of the increasing association of vegetables and fruits with foodborne disease outbreaks in recent years, few studies have focused on predicting the growth of pathogens on these foods (Sant'Ana et al., 2012; Tian et al., 2012; Puerta-Gomez et al., 2013; Danyluk et al., 2014; Park et al., 2014; Likotrafiti et al., 2014). Samples from each lot of uninoculated fruits and vegetables used in this study were analyzed for the presence of *E. coli* and *S. aureus* before inoculation. These bacteria were not detected on any of the samples analyzed (data not shown).

#### *3.2.1 Growth of *S. aureus* and mesophilic microorganisms in fruits and vegetables*

Results showed in Table 3 indicated that *S. aureus* did not grow on any of the evaluated fruits and vegetables stored at 10 °C for until 24 h. Similarly, Park et al. (2014) showed that *S. aureus* did not grow for 34 h on sweet pumpkin salad incubated at 15 °C. In the study of Likotrafiti et al. (2013), *Listeria monocytogenes*, a Gram-positive, did not grow on cucumber in 24 h at 10 °C.

On tomato, *S. aureus* did not grow in any evaluated temperature, indicating that this food did not support the growth of this pathogen (Table 3). Although tomatoes have a high water activity (0.99), their low pH (4.21) (Table 2) can constitute an unfavorable environment for microorganisms growth. In addition, Dhanawade & Sakhare (2014) found that lycopene from tomato showed effective inhibition against *Bacillus subtilis* and this may explain the inhibition of *S. aureus* on tomatoes in the present study.

At 20 °C, there was not *S. aureus* growth on grated carrot and green cabbage during 24 h (Table 3). At 30 °C, *S. aureus* was able to grow on grated carrot only after

24 h, but on green cabbage significant growth of *S. aureus* was observed after 6 h. The absence of *S. aureus* growth at 20 °C on these foods may be partially explained because of their composition. Purified ethanolic extracts of peeled and shredded carrots showed antimicrobial effect against a range of foodborne microorganisms like *S. aureus* and *L. monocytogenes* (Babic et al., 1994). Green cabbage had high quantity of DPPH (free radical scavenging activity), antioxidant activity and high anti-inflammatory activity, related to the prevention of chronic diseases associated to oxidative stress, such as in cancer and coronary artery disease (Sami et al., 2013). Rúa et al. (2010) demonstrated that various phenolic compounds (used in the European food industry as aromatizants or antioxidants or that are naturally present in plants) had shown antimicrobial activity against all or most of the *S. aureus* strains tested. Therefore, these antioxidants present in green cabbage may have inhibited the growth of *S. aureus*. Although there was no growth of *S. aureus* in the grated carrots and green cabbage, there was a significant growth of mesophilic bacteria in 24 h (Table 3). According to McLandsborough (2004) *S. aureus* is a relatively poor competitor with food microbiota. Thus, besides the food matrix, the growth of others bacteria may have inhibited *S. aureus* growth.

*S. aureus* did not grow on papaya at 20 °C for 6 h; however, after 24 h the final population increased 0.6 log CFU/g (Table 3). The inexpressive growth of *S. aureus* at 20 °C on this food may be also explained by its composition. Small amounts of papaya extract inhibited growth of *S. aureus* and *B. cereus*, showing this fruit contains an antibacterial substance (Emeruwa, 1982). These results suggested that the active principle or the antibacterial substances in papaya fruit are proteolytic enzymes like papain and chymopapain, which have antiviral, antifungal and antibacterial properties (Vij & Prashar, 2015).

Cucumber, watermelon and broccoli were foods in which *S. aureus* has multiplied faster. At 20 °C, the growth of *S. aureus* was detected on cucumber and watermelon only after 6 h; however, at 30 °C both foods supported growth of this microorganism after only 2 h. The growth of *S. aureus* on these foods can be explained because cucumber and watermelon have high water activity (0.98-0.99) and propitious pH (5.28-5.59) (Table 2) for the multiplication of bacteria.

On broccoli, at 20 and 30 °C, *S. aureus* growth began in less than 2 h ( $p < 0.05$ ). Furthermore, *S. aureus* on broccoli demonstrated higher final populations (8.14 log CFU/g at 20°C and 9.44 log CFU/g at 30°C). Broccoli was the food with pH closer to

neutrality (6.71), probably favoring the growth of *S. aureus*. Other factor that contributed with this result is the fact that broccoli was cooked, which may results in the elimination of competing flora and release of nutrient compounds.

### 3.2.2 Growth of *E. coli* and mesophilic microorganisms on fruits and vegetables

The results indicated that all evaluated fruits and vegetables incubated at 10 °C for until 6 h did not support growth of *E. coli*. On papaya, cucumber, watermelon and broccoli *E. coli* was able to grow in this temperature in 24 h of distribution (Table 4). Likotrafiti et al. (2014) analyzed the behavior of *Escherichia coli* O157:H7 on cucumber, lettuce and parsley at 10 °C and did not find growth of this microorganism in 24 h.

At 20 °C, there was *E. coli* growth on tomato after 6 h ( $p < 0.05$ ). At 30 °C, *E. coli* was able to grow on tomato in 4 h and the final population in 24 h reached 9.7 log CFU/g, indicating that this pathogen is more susceptible than *S. aureus* to growth in this food. Like on tomato, at 20 °C and 30 °C there was *E. coli* growth on grated carrot and green cabbage after 6 h and 4 h, respectively. The growth of mesophilic bacteria was similar to the growth of *E. coli* on these foods (Table 4).

In the other hand, papaya, cucumber, watermelon and broccoli demonstrated faster growth of *E. coli*. At 20 °C, *E. coli* was able to grow in 4 h, while at 30 °C *E. coli* was able to grow in 2 h ( $p < 0.05$ ) on these fruits and vegetables.

Thus, many food services claim that is difficult to be followed the temperature permitted by regulation (<5 °C) (Brasil, 2004; Frantz et al., 2008; Alves & Ueno, 2010).

Based on our results, fruits and vegetables kept at 10 °C did not demonstrate growth of *S. aureus* and *E. coli*, suggesting that foods maintained at temperatures lower than 10 °C would be conserved safe, at least during the period of distribution (6 h). On the other hand, our results demonstrated that *E. coli* was able to growth in less than 2 hours at 30 °C, indicating that fruits and vegetables have to be kept at refrigeration temperatures, especially in warm days.

### 3.3 Growth potential of *S. aureus* and *E. coli* on fruits and vegetables

According to Sant'Ana et al. (2013), the growth potential ( $\alpha$ ) of the pathogens was not able to growth on the foods when  $\alpha$  value was negative or lower than 0.5 log. Therefore, at 10 °C, only on papaya and watermelon *E. coli* demonstrated capacity to

grow after 24 h. On the other vegetables no growth was observed at 10 °C until 24 hours.

Comparing both microorganisms, *E. coli* demonstrated higher growth potential than *S. aureus* on all fruits and vegetables which were analyzed (Table 5). The higher growth potential of *S. aureus* ( $\alpha=4.38$  at 20 °C and  $\alpha=5.68$  at 30 °C) observed on broccoli than *E. coli* ( $\alpha=4.33$  at 20 °C and  $\alpha=6.28$  at 30 °C), as already reported in this study, was probably influenced by the heat treatment. Corroborating, Santos (2006) demonstrated that broccoli submitted to heat treatment presented a decrease in polyphenols, a natural antioxidant present in this vegetable. Besides that, cooked broccoli has smaller quantities of chlorophyll, vitamin C, total carotenoids and glucosinolate compared with raw broccoli (Yuan et al., 2009).

#### 4 Conclusion

This study demonstrated that *S. aureus* and *E. coli* did not grow on fruits and vegetables exposed to 10 °C during 6 h. *S. aureus* did not grow in 24 h in the foods analyzed, however, *E. coli* was able to grow on papaya, cucumber, watermelon and broccoli in the same time at 10 °C. At 20 °C, no growth was observed until 4 h, but at 30 °C, bacterial multiplication was observed in less than 2 h, suggesting that fruits and vegetables should be distributed under refrigeration temperatures, at least < 10 °C. This approach may be also a suggestion for food safety managers to better define the control measures to be adopted in food services, in order to prevent foodborne diseases vehiculated by fruits and vegetables.

#### Acknowledgements

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

FAUFRGS (Fundação de Apoio da Universidade do Rio Grande do Sul)

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico)

#### References

- Alves, M. G., Ueno M., 2010. Self-service restaurants: food safety and sanitary quality. Revista de Nutrição 23, 573-580.

Al-Kharousi, Z. S., Guizani, N., Al-Sadi, A. M., Al-Bulushi, I. M., Shaharoona, B., 2016. Hiding in Fresh Fruits and Vegetables: Opportunistic Pathogens May Cross Geographical Barriers. International Journal of Microbiology 2016, 1-14.

Babic, I., Nguyen-the C., Amiot M. J., Aubert S., 1994. Antimicrobial activity of shredded carrot extracts on food-borne bacteria and yeast. Journal of Applied Bacteriology 76, 135-141.

Brasil. Surtos de DTA Brasil, de 2000 a 2016. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos, Brasília, Brasil, 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 15 set. 2004, Seção 1, p. 25.

Cunha, D. T., Oliveira, A. B. A., Saccol, A. L. F., Tondo, E. C., Junior, E. A. S., Ginani, V. C., Montesano, F. T., Castro, A. K. F., Stedefeldt, E., 2014. Food safety of food services within the destinations of the 2014 FIFA World Cup in Brazil: Development and reliability assessment of the official evaluation instrument. Food Research International 57, 95-103.

Danyluk, M. D., Friedrich, L. M., Schaffner, D. W., 2014. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* on cut cantaloupe, honeydew and watermelon. Food Microbiology 38, 52-55.

Dhanawade, S. S., Sakhare, A. V., 2014. Isolation of lycopene from tomato and study of its antimicrobial activity. International Journal of Science and Research 3, 671-673.

EFSA. European Food Safety Authority, 2013. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). EFSA Journal 11, 3025-3163.

Emeruwa, A. C., 1982. Antibacterial substance from *Carica papaya* fruit extract. Journal of Natural Products 45, 123-127.

Estrada, C. S., Alcaráz, L. E., Satorres, S. E., Manfredi, E., Velázquez, L. C., 2014. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in artisan fruit salads in the city of San Luis, Argentina. Brazilian Journal of Microbiology 44, 1155-1161.

Frantz, C. B., Bender, B., Oliveira, A. B. A., Tondo, E. C., 2008. Avaliação de registros de processos de quinze unidades de alimentação e nutrição. Alimentos e Nutrição 19, 167-175.

Harris, L. J., Farber, J. N., Beuchat, L. R., Parish, M. E., Suslow, T. V., Garrett, E. H., Busta, F. F., 2003. Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh Cut Produce. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2, 78 – 141.

Ho, J., Boost, M., O'Donoghue, M., 2015. Sustainable reduction of nasal colonization and hand contamination with *Staphylococcus aureus* in food handlers, 2002-2011. Epidemiology and Infection 143, 1751-1760.

Hong, J., Kim, Y., Kim, J., Heu, S., Kim, S.-R., Kim, K.-P., Roh, E., 2015. Genetic diversity and antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from leaf vegetables in Korea. Journal of Food Science 80, 1526-1531.

Laidler, M. R., Toumajian, M., Buser, G. L., Hostetler, T., Repp, K. K., Leman, R., Samadpour, M., Keene W. E., 2013. *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of locally grown strawberries contaminated by deer. Clinical Infectious Diseases 57, 1129-1134.

Lambrechts, A. A., Human, I. S., Doughari, J. H., Lues, J. F. R., 2014. Bacterial contamination of the hands of food handlers as indicator of hand washing efficacy in some convenient food industries in South Africa. Pakistan Journal of Medical Science 30, 755–758.

Likotrafiti, E., Smirniotis, P., Nastou, A., Rhoades, J., 2013. Effect of Relative Humidity and Storage Temperature on the Behavior of *Listeria monocytogenes* on Fresh Vegetables. Journal of Food Research 33, 545-551.

Likotrafiti, E., Anagnou, M., Lampiri, P., Rhoades, J., 2014. Effect of Storage Temperature on the Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium on Salad Vegetables. Journal of Food Research 3, 1-7.

McLandsborough, L., 2004. Food Microbiology Laboratory. CDC Series in Contemporary Food Science, CDC Press, Boca Raton, FL.

Miles, A. A. L., & Misra, S. S., 1938. The estimation of the bacterial power of the blood. The Journal of Hygiene 38, 732–749.

Oliveira, A. B. A., Cunha, D. T., Stedefeldt, E., Capalonga, R., Tondo, E. C., Cardoso, M. R. I., 2014. Hygiene and good practices in school meal services: Organic matter on surfaces, microorganisms and health risks. Food Control 40, 120-126.

Park, A., Hwang, I.-G., Lee, S.-H., Cho, J.-I., Lee, S., Lee, H., Yoon, Y., 2014. Predictive Models to Describe Behavior of *Staphylococcus aureus* in Sweet Pumpkin Salad Under Constant and Dynamic Temperature. Journal of Food Safety 34, 257–262.

PBH. Produce for Better Health Foundation, 2015. Study on America's Consumption. State of the Plate. <http://www.pbhfoundation.org> (accessed 27.07.16).

Puerta-Gomez, A. F., Moreira, R. G., Kim, J., Castell-Perez, E., 2013. Modeling the growth rates of *Escherichia coli* spp. and *Salmonella* Typhimurium LT2 in baby spinach leaves under slow cooling. Food Control 29, 11-17.

Rio Grande do Sul. Secretaria da Saúde. Portaria Estadual 78, de 30 de janeiro de 2009. Estabelece os procedimentos de Boas Práticas para Serviços de Alimentação, a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado.

Rúa, J., Fernández-Alvarez, L., Gutiérrez-Larraínzar, M., Valle, P., Arriaga, D., García-Armesto, M. R., 2010. Screening of phenolic antioxidants for their inhibitory activity against foodborne *Staphylococcus aureus* strains. Foodborne Pathogens and Disease 7, 695-705.

Sami, R., Chun-Juan, L., Yan, Z., Ying, L., Chang-Hao, S., 2013. Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) Phytochemicals with Antioxidant and Anti-inflammatory Potential. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 14, 6657-6662.

Sant'Ana, A. S., Landgraf, M., Destro, M. T., Franco, B. D., 2013. Growth Potential of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce and collard greens packaged under modified atmosphere and in perforated film. Journal of Food Protection 76, 888-891.

Sant'Ana, A. S., Franco, B. D. G. M., & Schaffner, D. W., 2012. Modeling the growth rate lag time of different strains of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce. Food Microbiology 30, 267-273.

Santos, M. A. T., 2006. Effect of boiling on contents of antinutritional factors in leaves of broccoli, cauliflower and cabbage. Ciência e Agrotecnologia 30, 294-301.

Seo, Y.-H., Jang, J.-H., Moon, K.-D, 2010. Occurrence and characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from minimally processed vegetables and sprouts in Korea. Food Science and Biotechnology 19, 313-319.

Shah, M. S., Eppinger, M., Ahmed, S.; Shah, A. A., Hameed, A., Hansan, F., 2015. Multidrug-resistant diarrheagenic *E. coli* pathotypes are associated with ready-to-eat salad and vegetables in Pakistan. Journal Korean Society for Applied Biological Chemistry 58, 267–273.

Tian, J., Bae, Y. M., Choi, N. Y., Kang, D. H., Heu, S., Lee, S. Y., 2012. Survival and Growth of Foodborne Pathogens in Minimally Processed Vegetables at 4 and 15 °C. Journal of Food Science 71, 48-50.

Vij, T., Prashar, Y., 2015. A review on medicinal properties of *Carica papaya* Linn. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 5, 1-6.

Yuan, G. F., Sun, B., Yuan, J., Wang, Q. M., 2009. Effects of different cooking methods on health-promoting compounds of broccoli. Journal of Zhejiang University SCIENCE B 10, 580-588.

**Table 1.** Different treatments and processing applied to foods analyzed

Vegetable/ Fruit	Treatments	Processing
Carrot	Wash in running water for removal of dirt, sanitized	Grated (0.2 cm)
Tomato	with chlorine 200 ppm for 15 minutes and rinse under	Slices (0.5 cm)
Cucumber	running water to remove the chlorine residue (Rio	Slices (0.5 cm)
Cabbage	Grande do Sul, 2009).	Slices (0.2 cm)
Broccoli	Cooked for 3 minutes in boiling water.	Floret (4.0 cm)
Watermelon	The fruits peel was removed.	Pieces (4.0 cm <sup>2</sup> )
Papaya		

**Table 2.** pH and water activity ( $a_w$ ) of the all evaluated food

Food	pH	$a_w$
Tomato	4.21±0.04	0.991±0.006
Grated carrot	6.54±0.15	0.975±0.006
Green cabbage	6.24±0.42	0.959±0.004
Papaya	5.43±0.29	0.989±0.003
Cucumber	5.59±0.17	0.983±0.005
Watermelon	5.28±0.03	0.986±0.006
Broccoli	6.71±0.29	0.991±0.003

**Table 3.** Population (log CFU/g) of *S. aureus* and mesophilic microorganisms on fruits and vegetables storage at 10, 20 and 30 °C

Fruit/ Vegetables	Temperature (°C)	Storage (h)									
		0		2		4		6		24	
		<i>S. aureus</i>	Mesophilic	<i>S. aureus</i>	Mesophilic	<i>S. aureus</i>	Mesophilic	<i>S. aureus</i>	Mesophilic	<i>S. aureus</i>	Mesophilic
Tomato	10	3.83±0.16 <sup>a</sup>	3.80±0.30 <sup>a</sup>	3.54±0.55 <sup>a</sup>	3.67±0.41 <sup>a</sup>	3.48±0.37 <sup>a</sup>	3.73±0.42 <sup>a</sup>	3.50±0.44 <sup>a</sup>	4.10±0.27 <sup>a</sup>	3.67±0.38 <sup>a</sup>	3.81±0.24 <sup>a</sup>
	20	3.83±0.16 <sup>a</sup>	3.41±0.46 <sup>a</sup>	3.73±0.24 <sup>a</sup>	3.49±0.41 <sup>a</sup>	3.48±0.37 <sup>a</sup>	3.77±0.23 <sup>a</sup>	3.59±0.26 <sup>a</sup>	3.70±0.20 <sup>a</sup>	3.57±0.49 <sup>a</sup>	7.75±0.82 <sup>b</sup>
	30	3.69±0.43 <sup>a</sup>	3.67±0.46 <sup>a</sup>	3.48±0.35 <sup>a</sup>	3.88±0.46 <sup>a</sup>	3.48±0.37 <sup>a</sup>	4.29±0.22 <sup>b</sup>	3.54±0.47 <sup>a</sup>	4.29±0.24 <sup>b</sup>	3.92±0.16 <sup>a</sup>	9.00±0.22 <sup>c</sup>
Grated carrot	10	3.51±0.22 <sup>a</sup>	3.71±0.15 <sup>a</sup>	3.26±0.28 <sup>a</sup>	3.84±0.40 <sup>a</sup>	3.24±0.46 <sup>a</sup>	3.75±0.44 <sup>a</sup>	3.00±0.26 <sup>b</sup>	3.89±0.46 <sup>a</sup>	2.73±0.10 <sup>b</sup>	3.84±0.49 <sup>a</sup>
	20	3.51±0.22 <sup>a</sup>	3.72±0.24 <sup>a</sup>	3.08±0.31 <sup>a</sup>	3.93±0.56 <sup>a</sup>	3.13±0.28 <sup>a</sup>	3.75±0.24 <sup>a</sup>	3.13±0.20 <sup>a</sup>	4.20±0.71 <sup>a</sup>	2.85±0.21 <sup>b</sup>	6.36±1.09 <sup>c</sup>
	30	3.42±0.19 <sup>a</sup>	3.74±0.25 <sup>a</sup>	3.33±0.13 <sup>a</sup>	4.20±0.49 <sup>a</sup>	3.41±0.15 <sup>a</sup>	4.38±0.64 <sup>a</sup>	3.75±0.48 <sup>a</sup>	6.83±0.66 <sup>b</sup>	6.72±0.75 <sup>b</sup>	9.33±0.58 <sup>c</sup>
Green cabbage	10	3.62±0.13 <sup>a</sup>	3.66±0.07 <sup>a</sup>	3.60±0.12 <sup>a</sup>	3.68±0.22 <sup>a</sup>	3.44±0.19 <sup>a</sup>	3.66±0.18 <sup>a</sup>	3.13±0.39 <sup>a</sup>	3.61±0.10 <sup>a</sup>	3.54±0.12 <sup>a</sup>	4.94±0.70 <sup>b</sup>
	20	3.62±0.13 <sup>a</sup>	3.69±0.08 <sup>a</sup>	3.45±0.19 <sup>a</sup>	3.66±0.09 <sup>a</sup>	3.43±0.18 <sup>a</sup>	3.60±0.30 <sup>a</sup>	3.57±0.21 <sup>a</sup>	3.89±0.31 <sup>a</sup>	3.93±0.33 <sup>a</sup>	7.30±0.62 <sup>b</sup>
	30	3.62±0.13 <sup>a</sup>	3.71±0.11 <sup>a</sup>	3.57±0.20 <sup>a</sup>	3.59±0.13 <sup>a</sup>	3.78±0.24 <sup>a</sup>	4.15±0.19 <sup>b</sup>	4.44±0.15 <sup>b</sup>	4.98±0.11 <sup>c</sup>	6.35±0.57 <sup>d</sup>	8.11±0.20 <sup>e</sup>
Papaya	10	3.71±0.16 <sup>a</sup>	3.80±0.13 <sup>a</sup>	3.74±0.17 <sup>a</sup>	3.84±0.09 <sup>a</sup>	3.66±0.23 <sup>a</sup>	3.88±0.16 <sup>a</sup>	3.79±0.19 <sup>a</sup>	3.89±0.25 <sup>a</sup>	3.84±0.15 <sup>a</sup>	3.87±0.20 <sup>a</sup>
	20	3.72±0.19 <sup>a</sup>	3.77±0.14 <sup>a</sup>	3.81±0.16 <sup>a</sup>	3.84±0.18 <sup>a</sup>	3.82±0.27 <sup>a</sup>	3.65±0.45 <sup>a</sup>	3.79±0.18 <sup>a</sup>	3.89±0.25 <sup>a</sup>	4.39±0.23 <sup>b</sup>	4.90±0.85 <sup>b</sup>
	30	3.67±0.16 <sup>a</sup>	3.77±0.14 <sup>a</sup>	3.68±0.30 <sup>a</sup>	3.81±0.17 <sup>a</sup>	3.89±0.25 <sup>a</sup>	3.93±0.24 <sup>a</sup>	4.05±0.22 <sup>b</sup>	4.49±0.14 <sup>b</sup>	7.23±0.07 <sup>c</sup>	8.85±0.25 <sup>d</sup>
Cucumber	10	3.72±0.18 <sup>a</sup>	3.77±0.19 <sup>a</sup>	3.67±0.35 <sup>a</sup>	3.87±0.15 <sup>a</sup>	3.71±0.08 <sup>a</sup>	3.78±0.12 <sup>a</sup>	3.64±0.16 <sup>a</sup>	3.82±0.18 <sup>a</sup>	3.80±0.09 <sup>a</sup>	3.93±0.09 <sup>a</sup>
	20	3.65±0.09 <sup>a</sup>	3.70±0.16 <sup>a</sup>	3.60±0.22 <sup>a</sup>	3.84±0.15 <sup>a</sup>	3.81±0.14 <sup>a</sup>	3.87±0.11 <sup>a</sup>	3.83±0.24 <sup>a</sup>	4.09±0.14 <sup>b</sup>	5.43±0.22 <sup>c</sup>	7.26±0.32 <sup>d</sup>
	30	3.79±0.20 <sup>a</sup>	3.74±0.19 <sup>a</sup>	4.01±0.09 <sup>a</sup>	4.04±0.06 <sup>ab</sup>	4.81±0.15 <sup>b</sup>	4.80±0.15 <sup>b</sup>	5.79±0.16 <sup>c</sup>	6.00±0.07 <sup>c</sup>	8.34±0.30 <sup>d</sup>	9.17±0.11 <sup>e</sup>
Watermelon	10	3.71±0.16 <sup>a</sup>	3.82±0.22 <sup>a</sup>	3.77±0.13 <sup>a</sup>	3.84±0.11 <sup>a</sup>	3.79±0.19 <sup>a</sup>	3.85±0.24 <sup>a</sup>	3.75±0.07 <sup>a</sup>	3.91±0.12 <sup>a</sup>	3.89±0.05 <sup>a</sup>	4.02±0.05 <sup>a</sup>
	20	3.65±0.18 <sup>a</sup>	3.60±0.10 <sup>a</sup>	3.95±0.10 <sup>a</sup>	3.88±0.15 <sup>a</sup>	3.85±0.12 <sup>a</sup>	4.00±0.14 <sup>a</sup>	3.97±0.20 <sup>a</sup>	4.05±0.18 <sup>a</sup>	6.43±0.70 <sup>b</sup>	8.63±0.06 <sup>c</sup>
	30	3.71±0.17 <sup>a</sup>	3.82±0.22 <sup>a</sup>	3.97±0.27 <sup>a</sup>	4.07±0.10 <sup>ab</sup>	4.36±0.43 <sup>b</sup>	4.25±0.61 <sup>b</sup>	4.41±0.85 <sup>b</sup>	4.80±0.58 <sup>b</sup>	8.49±0.24 <sup>c</sup>	9.44±0.39 <sup>d</sup>
Broccoli	10	3.75±0.13 <sup>a</sup>	3.81±0.08 <sup>a</sup>	3.89±0.16 <sup>a</sup>	3.93±0.12 <sup>a</sup>	3.83±0.16 <sup>a</sup>	3.91±0.10 <sup>a</sup>	3.94±0.18 <sup>a</sup>	3.97±0.11 <sup>a</sup>	3.98±0.06 <sup>a</sup>	4.03±0.07 <sup>a</sup>
	20	3.76±0.13 <sup>a</sup>	3.81±0.08 <sup>a</sup>	4.00±0.13 <sup>b</sup>	4.03±0.10 <sup>b</sup>	4.29±0.08 <sup>c</sup>	4.23±0.08 <sup>c</sup>	4.50±0.23 <sup>c</sup>	4.62±0.12 <sup>c</sup>	8.14±0.09 <sup>d</sup>	8.12±0.04 <sup>d</sup>
	30	3.76±0.13 <sup>a</sup>	3.81±0.08 <sup>a</sup>	4.25±0.11 <sup>b</sup>	4.29±0.09 <sup>b</sup>	5.24±0.09 <sup>c</sup>	5.22±0.07 <sup>c</sup>	6.24±0.27 <sup>d</sup>	6.36±0.18 <sup>d</sup>	9.44±0.05 <sup>e</sup>	9.29±0.09 <sup>e</sup>

Data represent mean ± standard deviation of minimum 2 experimental repetitions.

Means with the same letter within a row are not significantly different ( $p > 0.05$ ).

**Table 4.** Populations (log CFU/g) of *E. coli* and mesophilic microorganisms on fruits and vegetables storage at 10, 20 and 30 °C

Fruit/ Vegetables	Temperature (°C)	Storage (h)									
		0		2		4		6		24	
		<i>E. coli</i>	Mesophilic	<i>E. coli</i>	Mesophilic	<i>E. coli</i>	Mesophilic	<i>E. coli</i>	Mesophilic	<i>E. coli</i>	Mesophilic
Tomato	10	3.24±0.21 <sup>a</sup>	3.33±0.17 <sup>a</sup>	3.28±0.17 <sup>a</sup>	3.29±0.19 <sup>a</sup>	3.32±0.27 <sup>a</sup>	3.41±0.10 <sup>a</sup>	3.06±0.25 <sup>a</sup>	3.28±0.13 <sup>a</sup>	3.27±0.11 <sup>a</sup>	3.59±0.05 <sup>b</sup>
	20	3.29±0.19 <sup>a</sup>	3.24±0.18 <sup>a</sup>	3.17±0.22 <sup>a</sup>	3.32±0.16 <sup>a</sup>	3.39±0.06 <sup>a</sup>	3.48±0.15 <sup>a</sup>	3.55±0.16 <sup>b</sup>	3.76±0.21 <sup>b</sup>	8.09±0.12 <sup>c</sup>	8.14±0.11 <sup>c</sup>
	30	3.27±0.19 <sup>a</sup>	3.36±0.11 <sup>a</sup>	3.50±0.13 <sup>a</sup>	3.42±0.32 <sup>a</sup>	4.94±0.11 <sup>b</sup>	5.09±0.17 <sup>b</sup>	6.49±0.25 <sup>c</sup>	6.38±0.22 <sup>c</sup>	9.70±0.15 <sup>d</sup>	9.76±0.07 <sup>d</sup>
Grated carrot	10	3.26±0.17 <sup>a</sup>	3.27±0.26 <sup>a</sup>	3.12±0.29 <sup>a</sup>	3.25±0.16 <sup>a</sup>	3.23±0.33 <sup>a</sup>	3.17±0.23 <sup>a</sup>	3.27±0.17 <sup>a</sup>	3.33±0.26 <sup>a</sup>	3.50±0.20 <sup>a</sup>	3.53±0.26 <sup>a</sup>
	20	3.26±0.16 <sup>a</sup>	3.38±0.27 <sup>a</sup>	3.30±0.17 <sup>a</sup>	3.22±0.38 <sup>a</sup>	3.46±0.37 <sup>ab</sup>	3.50±0.20 <sup>ab</sup>	3.78±0.18 <sup>b</sup>	3.84±0.24 <sup>b</sup>	8.16±0.16 <sup>c</sup>	8.40±0.19 <sup>c</sup>
	30	3.17±0.26 <sup>a</sup>	3.32±0.29 <sup>a</sup>	3.40±0.22 <sup>a</sup>	3.80±0.22 <sup>a</sup>	4.19±0.20 <sup>b</sup>	4.60±8.65 <sup>b</sup>	5.56±0.65 <sup>c</sup>	6.37±0.33 <sup>d</sup>	9.61±0.15 <sup>e</sup>	9.42±0.46 <sup>e</sup>
Green cabbage	10	2.97±0.31 <sup>a</sup>	3.09±0.32 <sup>a</sup>	2.91±0.30 <sup>a</sup>	3.20±0.25 <sup>a</sup>	3.15±0.24 <sup>a</sup>	3.10±0.20 <sup>a</sup>	3.09±0.10 <sup>a</sup>	3.21±0.27 <sup>a</sup>	2.93±0.19 <sup>a</sup>	3.00±0.25 <sup>a</sup>
	20	3.06±0.32 <sup>a</sup>	3.13±0.30 <sup>a</sup>	3.27±0.18 <sup>a</sup>	3.16±0.20 <sup>a</sup>	3.27±0.12 <sup>a</sup>	3.39±0.12 <sup>ab</sup>	3.45±0.26 <sup>b</sup>	3.55±0.21 <sup>b</sup>	6.24±0.35 <sup>c</sup>	6.32±0.31 <sup>c</sup>
	30	2.91±0.30 <sup>a</sup>	3.18±0.27 <sup>a</sup>	3.13±0.30 <sup>a</sup>	3.36±0.29 <sup>a</sup>	3.80±0.30 <sup>b</sup>	4.14±0.24 <sup>b</sup>	4.83±0.79 <sup>c</sup>	5.40±0.51 <sup>d</sup>	8.10±0.10 <sup>e</sup>	8.17±0.09 <sup>e</sup>
Papaya	10	3.05±0.23 <sup>a</sup>	3.48±0.15 <sup>a</sup>	3.04±0.33 <sup>a</sup>	3.37±0.23 <sup>a</sup>	2.89±0.21 <sup>a</sup>	3.44±0.22 <sup>a</sup>	2.91±0.18 <sup>a</sup>	3.47±0.17 <sup>a</sup>	3.82±0.19 <sup>b</sup>	4.00±0.15 <sup>b</sup>
	20	3.34±0.25 <sup>a</sup>	3.53±0.15 <sup>a</sup>	3.50±0.09 <sup>a</sup>	3.45±0.19 <sup>a</sup>	4.00±0.13 <sup>b</sup>	3.99±0.15 <sup>b</sup>	4.44±0.25 <sup>c</sup>	4.45±0.33 <sup>c</sup>	8.12±0.17 <sup>d</sup>	8.16±0.15 <sup>d</sup>
	30	3.00±0.25 <sup>a</sup>	3.50±0.14 <sup>a</sup>	4.05±0.08 <sup>b</sup>	4.01±0.10 <sup>b</sup>	5.42±0.11 <sup>c</sup>	5.44±0.17 <sup>c</sup>	6.89±0.10 <sup>d</sup>	6.82±0.22 <sup>d</sup>	9.06±0.20 <sup>e</sup>	9.11±0.29 <sup>e</sup>
Cucumber	10	3.21±0.18 <sup>a</sup>	3.32±0.15 <sup>a</sup>	3.04±0.26 <sup>a</sup>	3.37±0.16 <sup>a</sup>	3.24±0.10 <sup>a</sup>	3.36±0.17 <sup>a</sup>	3.09±0.22 <sup>a</sup>	3.48±0.23 <sup>a</sup>	3.60±0.11 <sup>b</sup>	3.76±0.10 <sup>b</sup>
	20	3.20±0.17 <sup>a</sup>	3.32±0.15 <sup>a</sup>	3.38±0.19 <sup>a</sup>	3.51±0.30 <sup>a</sup>	3.84±0.13 <sup>b</sup>	4.11±0.13 <sup>b</sup>	4.04±0.14 <sup>b</sup>	4.05±0.10 <sup>b</sup>	8.30±0.14 <sup>c</sup>	8.28±0.06 <sup>c</sup>
	30	3.25±0.20 <sup>a</sup>	3.24±0.20 <sup>a</sup>	3.80±0.21 <sup>b</sup>	3.87±0.14 <sup>b</sup>	5.51±0.20 <sup>c</sup>	5.65±0.27 <sup>c</sup>	7.00±0.14 <sup>d</sup>	7.07±0.18 <sup>d</sup>	9.21±0.14 <sup>e</sup>	9.34±0.26 <sup>e</sup>
Watermelon	10	3.45±0.21 <sup>a</sup>	3.54±0.16 <sup>a</sup>	3.08±0.18 <sup>a</sup>	3.45±0.14 <sup>a</sup>	3.04±0.09 <sup>a</sup>	3.44±0.13 <sup>a</sup>	3.43±0.21 <sup>a</sup>	3.57±0.12 <sup>a</sup>	4.05±0.09 <sup>b</sup>	4.04±0.13 <sup>b</sup>
	20	3.35±0.19 <sup>a</sup>	3.44±0.22 <sup>a</sup>	3.32±0.16 <sup>a</sup>	3.49±0.19 <sup>a</sup>	3.90±0.10 <sup>b</sup>	4.01±0.12 <sup>b</sup>	4.39±0.15 <sup>c</sup>	4.45±0.15 <sup>c</sup>	8.71±0.22 <sup>d</sup>	8.77±0.11 <sup>d</sup>
	30	3.38±0.18 <sup>a</sup>	3.45±0.21 <sup>a</sup>	3.92±0.09 <sup>b</sup>	4.04±0.06 <sup>b</sup>	5.36±0.03 <sup>c</sup>	5.36±0.04 <sup>c</sup>	7.12±0.21 <sup>d</sup>	7.10±0.13 <sup>d</sup>	9.49±0.19 <sup>e</sup>	9.40±0.20 <sup>e</sup>
Broccoli	10	3.33±0.26 <sup>a</sup>	3.40±0.23 <sup>a</sup>	3.35±0.17 <sup>a</sup>	3.60±0.19 <sup>a</sup>	3.30±0.27 <sup>a</sup>	3.55±0.27 <sup>a</sup>	3.57±0.22 <sup>a</sup>	3.52±0.36 <sup>a</sup>	3.80±0.14 <sup>b</sup>	3.81±0.46 <sup>b</sup>
	20	3.36±0.25 <sup>a</sup>	3.44±0.22 <sup>a</sup>	3.56±0.14 <sup>a</sup>	3.69±0.29 <sup>a</sup>	3.83±0.14 <sup>b</sup>	4.03±0.30 <sup>b</sup>	4.22±0.24 <sup>c</sup>	4.82±0.55 <sup>c</sup>	7.69±0.21 <sup>d</sup>	9.14±0.19 <sup>e</sup>
	30	3.28±0.31 <sup>a</sup>	3.42±0.23 <sup>a</sup>	4.00±0.20 <sup>b</sup>	4.13±0.17 <sup>b</sup>	5.61±0.29 <sup>c</sup>	5.62±0.32 <sup>c</sup>	6.92±0.27 <sup>d</sup>	7.06±0.13 <sup>d</sup>	9.55±0.27 <sup>e</sup>	9.89±0.12 <sup>e</sup>

Data represent mean ± standard deviation of minimum 2 measurements

Means with the same lowercase letter within a row are not significantly different (P &gt; 0.05).

**Table 5.** Growth potential ( $\alpha$ ) of *S. aureus* and *E. coli* on fruits and vegetables at 10, 20 and 30 °C

Fruit/ Vegetables	Temperature (°C)	Growth potential ( $\alpha$ )	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Tomato	10	-0.16±0.25	0.03±0.28
	20	-0.26±0.55	4.80±0.28
	30	0.23±0.20	6.43±0.21
Grated carrot	10	-0.78±0.21	0.24±0.19
	20	-0.66±0.27	4.90±0.22
	30	3.30±0.60	6.44±0.48
Green cabbage	10	-0.08±0.19	-0.04±0.26
	20	0.31±0.32	3.18±0.32
	30	2.73±0.57	5.19±0.34
Papaya	10	0.13±0.19	0.77±0.27
	20	0.67±0.14	4.78±0.23
	30	3.56±0.24	6.06±0.28
Cucumber	10	0.08±0.24	0.39±0.12
	20	1.78±0.27	5.10±0.17
	30	4.55±0.19	5.96±0.27
Watermelon	10	0.18±0.13	0.60±0.12
	20	2.78±0.59	5.36±0.34
	30	4.78±0.31	6.11±0.20
Broccoli	10	0.23±0.11	0.47±0.32
	20	4.38±0.24	4.33±0.25
	30	5.68±0.17	6.28±0.45

## **4.2 Artigo Científico 2**

### **Development of predictive model for the growth of *Escherichia coli* on tomato and simulation under real temperatures collected in food services**

Caroline Isabel Kothe, Fabiani Walker, Patrícia da Silva Malheiros, Eduardo Cesar Tondo

Artigo científico a ser submetido ao periódico *Food Microbiology*

#### **Abstract**

Tomato is a food commodity which can be contaminated by pathogenic microorganisms if processing and distribution conditions, as well as handling practices are not effective. The aim of this study was to develop primary and secondary models for the growth of *E. coli* on tomatoes exposed at 10, 20, 30 and 37 °C. Furthermore, the developed model was integrated, using real temperature data collected in food services. A total of 1158 temperature registers of tomato distribution were analyzed for this study. The results obtained by DMFit using constant temperatures of 10 °C and 20 °C demonstrated tomato lag phases of 42.5 h and 15.6 h, while at 30 and 37 °C, lag phases were 2.46 h and 2.13 h, respectively. Secondary model (Ratkowsky model) was able to describe the influence of temperature on exponential growth rate and lag phase considering temperatures ranging from 10 to 37 °C. Data collected inside food services indicated that tomatoes were distributed on *buffets* with temperatures of 0.2 to 29.3 °C and the highest temperature was considered the worst scenario. Secondary model indicated that *E. coli* was able to grow on tomatoes after 1.58 h at 29.30 °C. These findings may be useful for food safety managers to better control time and temperatures conditions of tomatoes distribution in restaurants and other food services.

**Keywords:** predictive modeling; indicative microorganisms; time and temperature binomial; salads

#### Highlights

- *E. coli* was able to grow on tomato at 10 °C only after 42.5 h

- Secondary model was able to predict the growth of *E. coli* at 10 to 37 °C on tomatoes
- Secondary model demonstrated *E. coli* growth on tomato in 1.58 h at 29.3 °C

## **1. Introduction**

Tomatoes are a popular commodity in homes and food service around the world. In terms of consumption, the tomato is the Nation's fourth most popular fresh-market vegetable behind potatoes, lettuce, and onions. Fresh and processed tomatoes account for more than \$2 billion in annual farm cash receipts in United States (USDA, 2016). According to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE, 2011), in terms of consumption, the tomato is too one of the most consumed vegetable, with a per capita average of 6.5 g/dia.

Tomatoes are often consumed raw with little or no post harvest physical or chemical treatment to reduce microbial loads. The absence of processing steps increases the potential of contamination reaching the consumer (Mahajan et al., 2014; WHO, 2015). The inherent risks of contamination by Foodborne pathogens present a challenge to the produce industry and regulators (Maitland et al., 2011).

*E. coli* is a Gram-negative, oxidase-negative, rod-shaped bacterium from the family Enterobacteriaceae (Croxen et al., 2013; PHE, 2015). Although *Escherichia coli* can be an innocuous resident of the gastrointestinal tract, some strains have the pathogenic capacity to cause significant diarrheal and extraintestinal diseases (Kaper et al., 2004; Croxen & Finlay, 2010). According to Leff & Fierer (2013) fresh fruits and vegetables may have significant amounts of Enterobacteriaceae, mainly due to contamination caused by contact with the soil. In addition, proper handling of these foods could be an important factor to consider in food service, to avoid growth of *E. coli* to hazard levels (Tan et al., 2014).

Temperature records are very important in food service, as they can contribute to the safety of food produced. According to Frantz et al. (2008) and Alves & Ueno (2010), many establishments have difficulty maintaining the temperature permitted by regulation (<5 °C) (Brasil, 2004). However, vegetables and fruits correspond for only 1.1% of the foods involved in Foodborne outbreaks notified in Brazil (Brasil, 2016).

To resolve these doubts, the predictive microbiology can predict the response of the growth of the microorganism in relation to variations in factors such as temperature, storage conditions, humidity and pH. It has emerged as an essential element of food

microbiology promoting the quality and safety of food, supporting risk analysis, evaluating the shelf life, developing new products and processes, combining actions on decision-making (Oliveira et al., 2013).

Furthermore, according to a previous study (Kothe et al., 2017 submitted), tomato was the most frequently served salads in the evaluated commercial restaurants ( $n = 50$ ). In this study, was evaluated the growth of *E. coli* on fruits and vegetables, and it was observed that the microorganism was able to grow on tomatoes even with low pH ( $4.21 \pm 0.04$ ). In this sense, the evaluation of the growth of *E. coli* in tomato exposed to different temperatures can provide important information for the safe distribution of this food. Thus, throughout this work, was performed an evaluation of *E. coli* growth in tomato exposed at 10, 20, 30 and 37 °C with times until reach stationary phase in each temperature. Primary (Baranyi model) and secondary (Ratkowsky model) models were obtained to predict the growth kinetic parameters and the square root equation, showing the growth rate and lag time in function of temperature of *E. coli* on tomato. Besides, data about real temperatures of cold distribution of tomatoes were collected from food services in Brazil and the critical temperatures were fitted using the secondary model generated.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Inoculum preparation

*E. coli* strain CQ (isolated from a hot dog served in a street vendor of Southern Brazil), ECHC (isolated from human cystitis), DH5- $\alpha$  (laboratory strain), ATCC 8739 and ATCC 25922 were cultured separately, in 5 mL Brain Heart Infusion broth (BHI, HiMedia), at 37 °C, for 18-24 h. The cultures of the five strains were mixed forming a pool, which was centrifuged at 14000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded and the cell pellets were washed twice with 0.1% peptone water (PW) and re-suspended in PW.

### 2.2 Sample Preparation and Inoculation

Fresh tomatoes (*Solanum lycopersicum*) cv Carmem were purchased from a local supermarket and kept in environmental temperature until use. The tomatoes were washed with running water in order to remove soils, sanitized with 200 ppm sodium hypochlorite for 15 minutes and rinsed with running water according to recommended

procedures (Rio Grande do Sul, 2009). Ten grams of 0.5 cm sliced tomatoes were transferred to sterile plastic bags, and 1 mL of the bacterial pool was homogeneously inoculated to each bag, in order to achieve initial concentration of  $\pm 3$  log CFU/g. Inoculated tomatoes were stored at 10, 20, 30 and 37 °C and samples were taken at different time until reaching the stationary phase with at least of 10 times.

### 2.3 Microbial Analyses

*E. coli* populations were enumerated adding 90 mL of 0.1% PW (HiMedia) to each plastic bag containing samples, followed by homogenization in stomacher for 1 min. Each sample was serially diluted with 0.1% PW and *E. coli* was quantified by drop method (Silva et al., 2010). The agar plates were incubated at 37 °C for 18-24 h, and colonies were counted manually. Non inoculated tomatoes were analyzed before experiments in order to verify the absence of *E. coli* and mesophilic bacteria. *E. coli* counts were done using Violet Red Bile Agar (VRB, Merck) and mesophilic microorganisms were quantified on plates of Brain Heart Infusion Agar (BHI, HiMedia). Experiments were performed at least in duplicate with three repetitions and the results were expressed as log CFU/g.

### 2.4 Model development

*E. coli* growth data were fitted to the Baranyi model (Baranyi & Roberts, 1994), which is shown in Equations 1 to 3:

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu_{\max} A(t) - \ln \left[ 1 + \frac{e^{\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{(N_{\max} - N_0)}} \right] \quad \text{Equation 1}$$

$$A(t) = t + \frac{\frac{1}{\mu_{\max}} \ln(e^{-\mu_{\max} t} + q_0)}{1 + q_0} \quad \text{Equation 2}$$

$$\lambda = \frac{\ln(1 + \frac{1}{q_0})}{\mu_{\max}} \quad \text{Equation 3}$$

where:  $\ln(N(t))$  = log of cell concentration at time t [h] (CFU/g);  $\ln(N_0)$  = log of initial cell concentration (CFU/g);  $\mu_{\max}$  = exponential growth rate (log CFU/g/h);  $\ln(N_{\max})$  = log of maximum cell concentration;  $q_0$  [-] = parameter expressing the

physiological state of cells when  $t = t_0$ ;  $\lambda$  = lag time (h). The model was used to calculate growth kinetic parameters, such as  $\mu_{max}$ ,  $\lambda$  and  $N_{max}$  with DMFit.

To evaluate the effect of storage temperature on the growth parameters, the square root model (Ratkowsky et al., 1982) was used in order to describe  $\mu$  and  $\lambda$  (Equation 4):

$$\sqrt{r} = b(T - T_0) \quad \text{Equation 4}$$

where:  $\sqrt{r}$  is the square root of maximum growth rate or of lag time,  $b$  is the slope of the regression line,  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) is temperature and  $T_0$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) is a conceptual minimum temperature for microbial growth.

### 2.5 Model evaluation

Measures of coefficient of determination ( $R^2$ ) and root mean square error (RMSE) were used to evaluate the performance of the primary and secondary models built in this study (Granato et al., 2014, Nunes et al., 2015). The determination of  $R^2$  was calculated for both models, while RMSE was only calculated for the secondary model. In addition, the software ComBase Predictor was used to estimate the growth parameters of *E. coli* considering intrinsic parameters ( $aw = 0.991$  and  $pH = 4.50$ ) for comparison with the data obtained in this study.

### 2.6 Data collection in food services

A multinational food service company was contacted in order to provide data about temperature distribution of salads on *buffets* of restaurants in Brazil. Data from 225 restaurants of three Brazilian regions were collected, i.e. 58 restaurants of Southern, 149 restaurants of Southeast and 18 restaurants of North/Northeast region. Tomatoes were the most frequently consumed vegetable salad served in these restaurants, and based on this fact it was selected to be analyzed in the present study. A total of 1158 temperature registers of tomato distribution on *buffets* were collected and analyzed in this study (332 Southern, 707 Southeast and 119 North / Northeast).

### 2.7 Simulation model

Data of cold chain distribution temperatures of tomatoes shown three well defined scenarios, and they were outlined with the maximum temperatures obtained in each

Brazilian region. They were fitted using the secondary model generated by experiments with tomato and by software ComBase.

## 5 Results and discussion

### 5.1 Tomato predictive model

The growth curves of *E. coli* on tomato exposed at 10, 20, 30 and 37 °C are shown in Figure 1. At 10 °C, *E. coli* needed approximately 200 h to reach to achieve stationary phase. At 20 °C, took around 35 h, while at 30 and 37 °C, the microorganism took around 15 h to achieve the stationary phase. Similar results were found in a study that evaluated *E. coli* growth on baby spinach leaves at the same temperatures (Puerta-Gomez et al., 2013).

*E. coli* growth curves started with an initial population of nearly 3.0 log CFU/g, and reached a final concentration of 7.0-8.0 log CFU/g in all temperatures evaluated. According to software ComBase Predictor, the final population in all temperatures was higher (around 8.7 log CFU/g) (Table 1). In contrast, Puerta-Gomez et al. (2013) studied the growth of *E. coli* on baby spinach leaves and demonstrated final concentration of stationary phase was different in each temperature evaluated. At 10 and 20 °C, the final population of *E. coli* was 4.0-4.5 log CFU/g, at 30 °C, the microorganism reached around 6 log CFU/g and at 37 °C, the final population was 7.5 log CFU/g. However, the initial concentration of *E. coli* in the study of Puerta-Gomez et al. (2013) was 2 log CFU/g, which is lower than initial population used in the present study. On the other hand, a study analyzed the growth of *E. coli* O157: H7 on iceberg lettuce and the maximum population densities were 5.89 to 6.80 log CFU/g at 10 to 25 °C, respectively, and the initial concentration was 4.5 log CFU/g (Koseki & Isobe, 2005). The differences in the final concentrations of *E. coli* on these foods may have occurred due to nutrients available to the microorganisms. Although the tomato pH is low, probably the carbohydrates or proteins present in this food are more accessible than on leafy vegetables (lettuce and spinach), providing greater condition for multiplication of *E. coli*. This is because, despite both vegetables have plant cuticle, tomato was cut in slices, as served in the food services, exposing the fleshy part and facilitating the multiplication of microorganisms.

The growth curves for *E. coli* cocktail inoculated on tomatoes showed different lag phases and exponential growth rate for each evaluated temperature (Table 1). The lag

phase was higher (42.54 h) at lower temperatures (10 °C), while the exponential growth rate was lower (0.04 log CFU/g/h at 10 °C). At 20 °C, the lag phase was 15.64 h and the exponential growth rate was 0.25 log CFU/g/h. Koseki & Isobe (2005) analyzed growth of *E. coli* O157:H7 on iceberg lettuce and found lower lag phase times and similar growth rates. At 10 °C, the grow rate was 0.03 log CFU/g/h and lag time was 32.58 h, while at 20 °C the growth rate of *E. coli* O157:H7 on lettuce was 0.26 log CFU/g/h and the lag time was 5.17 h. FDA reported (FDA, 2015) shorter lag times for *Salmonella* on cut Roma tomatoes (2.88 to 3.81 h) and on cut beefsteak tomatoes (5.29 to 7.49 h), at 22.2 °C. In the same study, the exponential growth rates for both tomatoes analyzed (Roma and beefsteak) was similar to results of our study (0.22 to 0.29 log CFU/g/h).

ComBase predicted slower growth rates and higher lag phases than were those observed in our experiments on tomatoes (Table 1) and by Kosebi & Isobe (2005) and FDA (2015). However, ComBase showed the increase of growth rates and the decrease of lag phase when the temperature was increased.

The data obtained in primary model ( $\mu$  and  $\lambda$  values) were used to elaborate a secondary model (Table 2), which allowed the prediction of growth rate and lag time described on the basis of the temperature variation. The developed secondary model was able to assess the growth of *E. coli* on tomato under various temperatures, ranging from 10 to 37 °C. It can be observed that there is a good fit between the experimental data and the secondary model, because the coefficient of determination ( $R^2$ ) was close to 1 (0.88-0.91), showing the precision of model developed. Besides that, the small value of RMSE (0.14-0.59) indicates that this model has a good fit. Based on these results, our model was considered adequate for modeling the growth of *E. coli* on tomato under various temperature conditions.

## 5.2 Simulation model: outgrowth of *E. coli* at different temperatures scenarios in food service in Brazil

Descriptive statistics of the collected tomatoes distribution temperature values in food services is presented in Table 3. Mean distribution temperature ranged from 9.27 to 11.18 °C in the Brazilian regions evaluated (Southern, Southeast and North/Northeast), although maximum values ranged from 22.30 to 29.30 °C. The Southeast was the region with the highest mean and maximum temperatures values (11.18 and 29.30 °C, respectively). The higher distribution temperatures observed in the

Southeast region was probably due to the São Paulo legislation (São Paulo, 2013), which is the main city belonging to the Brazilian Southeast. This legislation provides specific parameters of time and temperature in the distribution of food. At temperatures up to 10 °C, refrigerated foods have a maximum of four hours to be consumed, while at temperatures between 10 to 21 °C, the maximum time is two hours. On the other hand, Brazilian national legislation (Brasil, 2004) for food services does not establish specific period for distribution, it only indicates that refrigerated foods should be conserved at <5 °C, for less than five days.

In this study, a square-root secondary model was used to estimate outgrowth of *E. coli* on tomatoes exposed to different temperatures. In Table 2 are demonstrated the growth rates and lag times in function of temperatures according to the secondary model. Temperatures were chosen based on three scenarios created with the maximum temperatures observed on the records of distribution temperatures collected in each Brazilian region evaluated. These temperatures were used to simulate exponential growth rate ( $\mu$ ) and lag time ( $\lambda$ ) possible occurred in tomato distribution of food services.

The first scenario was created with the maximum temperature found in the food services of Southern Brazil (25.0 °C). For our model, the exponential growth rate in this temperature was 0.64 log CFU/g/h, while the lag time was 1.82 h. As for the model generated in ComBase, the exponential growth rate was lower (0.55 log CFU/g/h) and the lag time was greater (2.43 h).

The second scenario was generated taking into account the maximum temperature found in tomato distribution in the Southeast region. This scenario was the most critical in this study, with temperature of 29.30 °C. For our predictive model generated by tomato experiments, the exponential growth rate was the fastest (0.70 log CFU/g/h), while the lag phase is the lowest (1.58 h). As for the model generated in ComBase, the exponential growth rate was 0.59 log CFU/g/h and the lag time was 2.06 h.

The third scenario was created considering the maximum temperature registered in the North/Northeast (22.30 °C). For our model, the exponential growth rate in this temperature was 0.60 log CFU/g/h, while the lag time was 1.95 h. The model generated in ComBase predicted an exponential growth rate of 0.51 log CFU/g/h and a lag time of 2.64 h.

As the distribution usually occurs rapidly, it is not commonly appear Foodborne outbreak in ready-to-eat food in food services, probably because there is no time for pathogens multiplication. According to Sant'Ana et al. (2013), the growth of the microorganism is considered when the value is high than 0.5 log CFU/g. Therefore, in these maximum temperatures found in the records, there was *E. coli* multiplication in less than one hour ( $\mu > 0.50 \text{ log CFU/g/h}$ ).

## 6 Conclusion

This study demonstrated that *E. coli* was able to grow on tomato at 10 °C only after 42.5 h, indicating that this temperature could be safe for tomato distribution in food services. However, when tomatoes were exposed to higher temperatures, bacterial growth was detected only in 2.13 hours, justifying why tomatoes should be distributed refrigerated. Corroborating these findings, the secondary model generated for *E. coli* growth on tomatoes demonstrated that this microorganism exposed to 29.30 °C was able to growth only after 1.58 hours. This information can be useful to food service's managers in order to set up time/temperature control for distribution of tomatoes.

## Acknowledgements

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

FAURGS (Fundação de Apoio da Universidade do Rio Grande do Sul)

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico)

## References

- Alves, M. G., & Ueno M. (2010). Self-service restaurants: food safety and sanitary quality. *Revista de Nutrição*, 23, 573-580.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.
- Brasil. (2004). Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 15 set. 2004, Seção 1, p. 25.

Brasil. (2016). Dados Surtos de DTA Brasil, de 2000 a 2016. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos, Brasília.

Croxen M. A., & Finlay B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 26–38.

Croxen, M. A., Law, R. J., Schols, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finaly, B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26 (4), 822-880.

FDA, Food and Drug Administration. Program information manual retail food protection—storage and handling of tomatoes. (2015). <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/IndustryandRegulatoryAssistanceandTrainingResources/ucm113843.htm>. Accessed 05.01.2017.

Frantz, C. B., Bender, B., Oliveira, A. B. A., & Tondo, E. C. (2008). Avaliação de registros de processos de quinze unidades de alimentação e nutrição. *Alimentos e Nutrição*, 19(2), 167-175.

Granato, D., Calado, V. M. A., & Jarvis, B. (2014). Observations on the use of statistical methods in food science and technology. *Food Research International*, 55, 137–149.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2011). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>. Accessed 29.12.2016.

Kaper J. B., Nataro J. P., & Mobley H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 123–140.

Koseki, S., & Isobe, S. (2005). Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 239-248.

Kothe, C. I. K, Pessoa, J. P., Elias, S. O., Malheiros, P. S., & Tondo, E. C. (2017). Assessing the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* on fruits and vegetables exposed at 10, 20 and 30 °C. (Submitted)

Leff, J. W., & Fierer, N. (2013). Bacterial Communities Associated with the Surfaces of Fresh Fruits and Vegetables. *PLoS One*, 8(3), 1-9.

Mahajan, P. V., Caleb, O. J., Singh, Z., Watkins, C. B., & Geyer, M. (2014). Postharvest treatments of fresh produce. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 372, 1-19.

Maitland, J. E., Boyer, R. R., Eifert, J. D., & Williams, R. C. (2011). High hydrostatic pressure processing reduces *Salmonella enterica* serovars in diced and whole tomatoes. *International Journal of Food Microbiology*, 149(2), 113–117.

Nunes, C. A., Alvarenga, V. O., Sant'Ana, A. S., Santos, J. S., & Granato, D. (2015). The use of statistical software in food science and technology: Advantages, limitations and misuses. *Food Research International*, 75, 270–280.

Oliveira, A. P., Rezende, C. S. M., Sola, M. C., Feistel, J. C., & Oliveira, J. J. (2013). Microbiologia Preditiva. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, 9(17), 1909-1927.

PHE, Public Health England. (2015). UK Standards for Microbiology Investigations Identification of Enterobacteriaceae. Standards Unit, Microbiology Services, *PHE Bacteriology*, 4, 1-34.

Puerta-Gomez, A. F., Moreira, R. G., Kim, J., & Castell-Perez, E. (2013). Modeling the growth rates of *Escherichia coli* spp. and *Salmonella* Typhimurium LT2 in baby spinach leaves under slow cooling. *Food Control*, 29, 11-17.

Ratkowsky, D. A., Ollei, J., McMeekin, T. A., & Ball, A. (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*, 149 (1), 1-5.

Rio Grande do Sul. (2009). Portaria Estadual 78, de 30 de janeiro de 2009. Estabelece os procedimentos de Boas Práticas para Serviços de Alimentação, a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado. Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul.

Sant'Ana, A. S., Landgraf, M., Destro, M. T., & Franco, B. D. (2013). Growth Potential of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce and collard greens packaged under modified atmosphere and in perforated film. *Journal of Food Protection*, 76(5), 888-891.

São Paulo. (2013). Portaria CVS 5, de 09 de abril de 2013. Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação. Diário Oficial Eletrônico, Centro de Vigilância Sanitária.

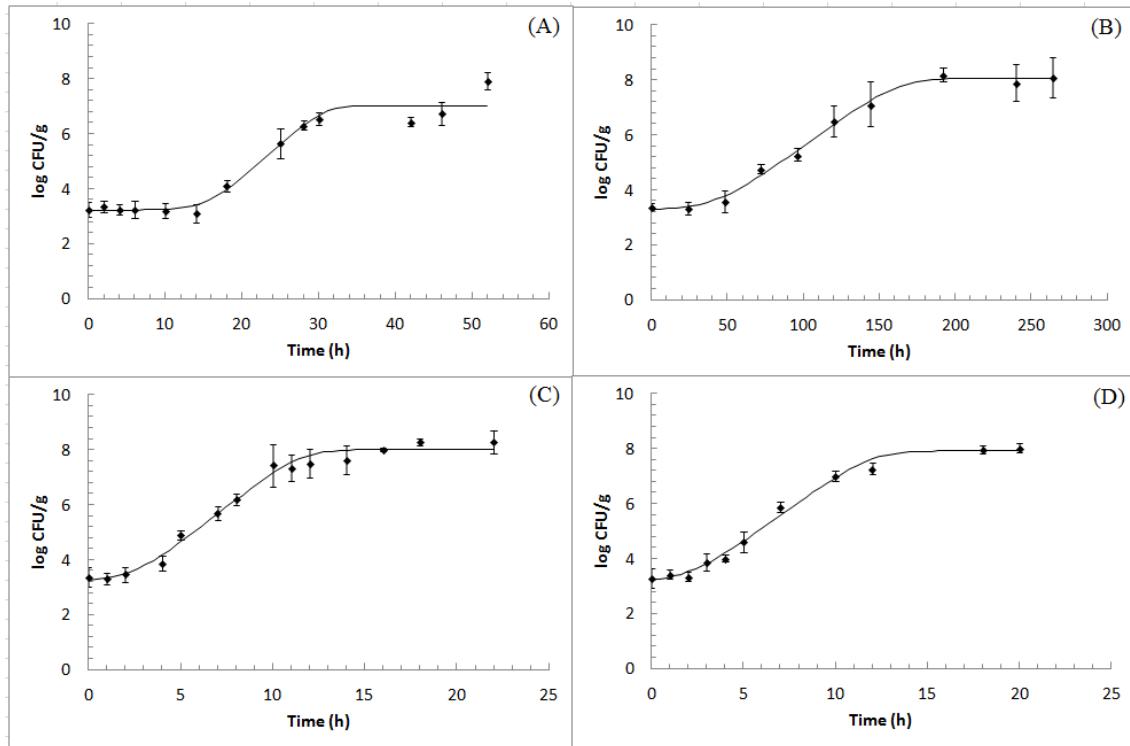
Silva, N., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A, Taniwaki, M. H., Santos, R. F. S., & Gomes, R. A. R. (2010). *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*. (4th ed.). São Paulo: Livraria Varela.

Tan, S. L., Lee, H. Y., & Mahyudin, N. A. (2014). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from food handler's hands. *Food Control*, 44, 203-207.

United States Department of Agriculture, USDA. (2016). Tomatoes. [Fresh Tomato Industry Processing Tomato Industry](https://www.ers.usda.gov/). <https://www.ers.usda.gov/>. Accessed 29.12.2016.

World Health Organization, WHO. (2015). Food Safety: What you should know.  
<http://www.searo.who.int/>. Accessed 03.01.2017

**Figure 1.** Growth of *E. coli* on tomato stored at 10 °C (A), 20 °C (B), 30 °C (C), 37 °C (D), fitting data to DMFit/ ComBase. Each spot represents a mean of duplicate results



**Table 1:** Growth kinetic parameters of *E. coli* on tomato compared to ComBase Predictive Models at different temperatures.

Growth Parameters	Model	Temperature (°C)			
		10	20	30	37
$\mu_{\max}$		0.04±0.01	0.25±0.05	0.53±0.05	0.48±0.04
$\lambda$	Tomato	42.54±7.97	15.64±2.48	2.46±0.72	2.13±0.65
FP		8.06±0.12	7.02±0.23	8.01±0.13	7.92±0.15
$\mu_{\max}$	ComBase	0.01±0.01	0.06±0.01	0.16±0.01	0.17±0.01
$\lambda$	( <i>E. coli</i> )	187.57±3.25	25.95±0.41	9.63±0.17	8.68±0.17
FP		8.66±0.03	8.69±0.01	8.68±0.02	8.69±0.01

$\mu_{\max}$  = exponential growth rate (log CFU/g/h);  $\lambda$  = lag time (h); FP = final population (log CFU/g).

**Table 2:** Secondary model represented by square root equation, showing the growth rate and lag time in function of temperature of *E.coli* on tomato and calculated from ComBase.

	Secondary model	R <sup>2</sup>	RMSE
<b>Tomato</b>	$\sqrt{(\mu)} = 0.019 (T - 3.218)$	0.88	0.14
	$\sqrt{(\lambda)} = -0.188 (T - 42.660)$	0.91	0.59
<b>ComBase</b>	$\sqrt{(\mu)} = 0.012 (T - 0.007)$	0.95	0.03
	$\sqrt{(\lambda)} = -0.387(T - 40.284)$	0.81	1.94

$\mu$  = growth rate (log CFU/g/h);  $\lambda$  = lag time (h); T = temperature (°C); R<sup>2</sup> = coefficient of determination; RMSE = root mean square error.

**Table 3.** Descriptive statistics of tomatoes temperature data collected in food services in three regions of Brazil.

Distribution temperature (°C)	Southern	Southeast	North/Northeast
Minimum	0.20	2.10	2.50
Maximum	25.00	29.30	22.30
Mean	10.82	11.18	9.27
Standard deviation	4.93	4.38	4.62

### **4.3 Artigo Científico 3**

#### **Predictive models to describe behavior of *Staphylococcus aureus* on heat treated broccoli florets under constant temperature**

Caroline Isabel Kothe, Patrícia da Silva Malheiros, Eduardo Cesar Tondo

Artigo científico a ser submetido ao periódico *International Journal of Food Science & Technology*

#### **Abstract**

This study developed predictive models to describe the behavior of *Staphylococcus aureus* on heat treated broccoli florets. A pool of 5 *S. aureus* strain was inoculated on 10 g portions of cooked broccoli. The samples were stored at 10, 20, 30 and 37 °C, and colonies were enumerated at different time intervals. The growth data were fitted to the Baranyi model in order to calculate lag phase duration (h), exponential growth rate (log CFU/g/h) and final population (log CFU/g). The growth parameters were then fitted to secondary models as function of storage temperature. The lag phase was 1.4 h when the broccoli was exposed to 30 and 37 °C, while at 20 °C and 10 °C lag phases were 5.3 h and 160 h, respectively. The exponential growth rate was 0.07 CFU/g/h at 10 °C, 0.18 CFU/g/h at 20 °C, 0.56 18 CFU/g/h at 30 °C and 0.88 18 CFU/g/h at 37 °C. Already the final population was 6.9 log CFU/g at 10 °C, while at 20, 30 and 37 °C were approximately 9.0 log CFU/g. The coefficient of determination ( $R^2$ ) to secondary model was 0.94-0.98 and the root mean square error (RMSE) was 0.04-0.95. The results indicate that the developed mathematical models can be used to adequately describe the behavior of *S. aureus* on broccoli as a function of temperatures from 10 to 37 °C.

**Keywords:** modeling predictive; foodborne pathogen; time; salads

#### **Highlights**

- There was no multiplication of *S. aureus* on cooked broccoli at 10 °C for 160 h.
- The lag phase of *S. aureus* on heat treated broccoli was only 1.4 h, at 30 °C.
- The lag phase of *S. aureus* on heat treated broccoli florets was 5.3 h at 20 °C
- The model can be used to predict the growth of *S. aureus* on broccoli at 10-37 °C.

## 1 Introduction

Fruit and vegetable consumption is increasing due the high demand for healthy and nutritious food. Factors such as low price of meals, aging of a population and consumer awareness of the importance of these products, contribute to the increase their consumption (Pollack, 2001; Slavin & Lloyd, 2012).

Heat treatments can be used to improve vegetable quality, but are not sufficient to inactivate all microorganisms present on raw materials (Peng et al., 2015). In addition, contamination of vegetable may occur after heat processing due to presence of microorganisms in the environment, on surfaces or in food handlers (FSIS, 2012; CFS, 2014). It is therefore crucial to consider prevent post-process or cross contamination and growth of pathogens in heat treated vegetables.

The demand for broccoli has recently increased due to its low caloric value and its high content of nutrients such as vitamins A and C, antioxidants, and fibers (Gómez-Lobato et al., 2014). Besides that, recent studies have indicated that broccoli contains high levels of anti-carcinogenic compounds such as glucosinolates (Mukherjee et al., 2007; Oliviero et al., 2014). According to a previous study, cooked broccoli was served 4 days per week in 50 commercial restaurants of Southern Brazil (Kothe et al., submitted). In addition, the study evaluated the *Staphylococcus aureus* growth on fruits and vegetables and heat treated broccoli was the vegetable presenting the highest growth potential, demonstrating to be a food vulnerable to the growth of *S. aureus* (Kothe et al., submitted).

*S. aureus* is a Gram-positive bacterium frequently found on human nares and skin (Ho et al., 2015). This bacterium is among the microorganisms most involved in foodborne outbreaks in Brazil (Brasil, 2016). Besides, this microorganism has been detected on fresh fruit and vegetable, and outbreaks involving these foods have been reported (CDC, 2013; Estrada et al., 2014; Harris et al., 2003; Hong et al., 2015; Seo et al., 2010; Al-Kharousi., 2016). *S. aureus* can produce enterotoxins, causing foodborne diseases. In order to produce sufficient amount of toxin required for a food poisoning, a population of at least 5 log CFU/g is necessary (Lindqvist et al., 2002). Therefore, it is important that the food is kept in adequate time/temperature that do not favor its growth.

Primary model used in predictive microbiology describes the growth data under constant environmental conditions (Baranyi & Roberts, 1994), while secondary model

describes the dependence of primary model parameters on environmental factors such as temperature, water activity, and pH (Ratkowsky et al., 1982). The constant improvement in temperature control and elaboration of general sanitary-hygienic requirements are a key factor for the maintenance of food safety (Sacco et al., 2015).

In this sense, the aim of this study was to evaluate *S. aureus* growth on heat treated broccoli exposed to different temperatures in order to assess important information for the safe storage and distribution of this food.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Inoculum preparation

*S. aureus* strains 4668/03 (isolated from a food involved in a foodborne outbreak in Southern Brazil), *S. aureus* S6 (isolated from stainless steel before cleaning and disinfection), *S. aureus* S8 (isolated from a cutting board before cleaning and disinfection), *S. aureus* ATCC 2998 and *S. aureus* ATCC 25923 (acquired from Culture Collection stock of Microbiology Laboratory), were selected to this study.

Each strain of *S. aureus* was cultured in 5 mL of Brain Heart Infusion broth (BHI, HiMedia), at 37 °C, for 18-24 h. After incubation, 2 mL of each strain was mixed in a sterile tube. The mixture was centrifuged for 5 min at 14000 rpm. The supernatants were discarded and the pellets were washed twice with 0.1% peptone water. The final cell concentration was evaluated through optical density 0.5 ( $OD_{630nm}$ ), reaching  $10^8$  CFU/mL. Decimal serial dilutions in 0.1% peptone water were prepared and the bacterial cocktail was inoculated to reach a final concentration on broccoli of approximately 3.5 log CFU/g.

### 2.2 Sample preparation and microbiological analyses

Broccoli was acquired from a supermarket in Porto Alegre city, Brazil. The vegetable heads were chopped into florets with 4 cm in length and cooked for 3 minutes in boiling water. After that, broccoli was removed and cooled from 60 to 10 °C in 2 h according Brazilian legislation (Brasil, 2004).

Broccoli was divided in samples of 10 g into sterile plastic bags, and contaminated with 1 ml of the inoculums (3.5 log UFC/g). Subsequently, samples were incubated at 10 °C, 20 °C, 30 °C and 37 °C. Samples were taken until reaching the stationary phase in order to thoroughly examine different scenarios. In order to test

microbial contamination, 10 g of broccoli were homogenized in 90 mL of 0.1% peptone water (HiMedia) in a stomacher and the sample was then serially diluted. *S. aureus* counts were done using Baird-Park Agar (BP, Oxoid) and mesophilic microorganisms were quantified on plate Brain Heart Infusion Agar (BHI, HiMedia). Both microorganisms were quantified by drop method (Miles & Misra, 1938) and all plates were incubated at 37 °C/ 18-24 h. Uninoculated controls were included to verify the absence of *S. aureus* on broccoli. The results were expressed as log CFU/g. Averages and standard deviations of the transformed values were then calculated.

### 2.3 Modeling of *S. aureus* growth on broccoli

The predictive primary model described by Baranyi & Roberts (1994) was applied in this study to calculate the growth kinetic parameters of *S. aureus* on broccoli. The growth curve for each temperature was plotted by fitting data to the Baranyi's DMFit software. The parameters obtained were: maximum growth rate, *lag time* and maximum population density. The following Baranyi & Roberts (1994) equations were used.

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu_{\max} A(t) - \ln \left[ 1 + \frac{e^{\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{(N_{\max} - N_0)}} \right] \quad \text{Equation 1}$$

$$A(t) = t + \frac{\frac{1}{\mu_{\max}} \ln(e^{-\mu_{\max} t} + q_0)}{1 + q_0} \quad \text{Equation 2}$$

$$\lambda = \frac{\ln(1 + \frac{1}{q_0})}{\mu_{\max}} \quad \text{Equation 3}$$

where:  $\ln(N(t))$  = log of cell concentration at time  $t$  [h] (CFU/g);  $\ln(N_0)$  = log of initial cell concentration (CFU/g);  $\mu_{\max}$  = exponential growth rate (log CFU/g/h);  $\ln(N_{\max})$  = log of maximum cell concentration;  $q_0$  [-] = parameter expressing the physiological state of cells when  $t = t_0$ ;  $\lambda$  = lag time (h).

The predictive secondary model was built using the square root model described by Ratkowsky et al. (1982) in order to describe  $\mu$  and  $\lambda$  as a function of storage temperature (Equation 4):

$$\sqrt{r} = b(T - T_0) \quad \text{Equation 4}$$

where:  $\sqrt{r}$  is the square root of maximum growth rate or of lag time,  $b$  is the slope of the regression line,  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) is temperature and  $T_0$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) is a conceptual minimum temperature for microbial growth.

#### 2.4 Model evaluation

The following statistical indices were used to evaluate the goodness of fit. The coefficient of determination ( $R^2$ ) is usually applied to determine how well a linear or a non-linear model fit the data. If the  $R^2$  is closer to 1, the model had greater precision (Neter et al., 1996). The root mean square error (RMSE) measures the average deviation between the observed and fitted values (Equation 5). Small RMSE values in a model indicate a closer fit with the data for that model (Buzrul & Alpas, 2004):

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum(\text{fitted} - \text{observed})^2}{n - p}} \quad \text{Equation 5}$$

where:  $n$  is the number of observations and  $p$  is the number of parameters to be estimated.

In addition, ComBase Predictor was used to estimate the growth parameters of *S. aureus* with the similar intrinsic parameters ( $\text{aw} = 0.991$  and  $\text{pH} = 6.71$ ) of the heat treated broccoli for comparison with the data obtained in this study.

### 3 Results and discussion

*S. aureus* growth curves started with an initial population of nearly 3.5 log CFU/g, and reached a final concentration of 9 log CFU/g, after 10 h, 15 h and 50 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ , 30  $^{\circ}\text{C}$  and 20  $^{\circ}\text{C}$ , respectively. For 10  $^{\circ}\text{C}$ , 7 log CFU/g were reached after 288 h (Figure 1). It can be observed that the temperature had a considerable influence on the microbial behavior, because the final concentration at 10  $^{\circ}\text{C}$  was the lowest. The mesophilic counts (data not shown) were similar than *S. aureus* counts at 20, 30 and 37  $^{\circ}\text{C}$ , but higher at 10  $^{\circ}\text{C}$ . This may be explained by the long exposition of broccoli to this low temperature, which favors growth of mesophilic bacteria resulting in less growth of *S. aureus* and the growth of bacteria food spoilage.

Tian et al. (2012) evaluated the growth of foodborne pathogens, at 15  $^{\circ}\text{C}$ , on minimally processed vegetables. *S. aureus* grew 2 log CFU/g on romaine and iceberg

lettuce; 1 log CFU/g on perilla leaves; and 3 log CFU/g on sprouts in 7 days of storage (168 h); similar to the results found in this study.

Table 1 presents the primary growth parameters (growth rate, lag time and maximum population density) of *S. aureus* on broccoli stored at different temperatures. The lag phase was greater at lower temperatures. At 30 °C and 37 °C the results were similar, i.e. *S. aureus* did not grow for only 1.4 h; whereas at 20 °C the lag time was 5.3 h and at 10 °C, 160 h. The growth rate increased as the temperature increased. For 10 °C the rates was 0.07 log CFU/g/h, at 20 °C was 0.18 log CFU/g/h and at 30 °C was 0.56 log CFU/g/h. Although the lag phases were similar at 30 and 37 °C, the growth rate was much higher at 37 °C (0.88 log CFU/g/h).

Lee et al. (2015) evaluated the growth of *S. aureus* on raw pork. At 10 °C, *S. aureus* required approximately 180 h to reach 5-6 log CFU/g, the final population was 7.23 log CFU/g and the  $\mu_{\max}$  was 0.04 log CFU/g/h. Even though the food evaluated was different from broccoli, the results obtained by Lee et al. (2015) concerning *S. aureus* were similar to our study. Wu & Su (2014) studied the growth of *S. aureus* on pre-cooked tuna meat and found lower counts for this pathogen at 37 °C comparing with our results. The increase of bacterial counts at 37 °C for 8 h varied from 2.50 to 4.25 log CFU/g, while in the present study it was 5 log CFU/g. On the other hand, Marc et al. (2009) evaluated the growth of *S. aureus* in milk and found 1.2 h of lag time at 25 °C and the growth rate 0.90 log CFU/g/h. The different values of *S. aureus* growth in milk were due to this food being rich in nutrients favoring multiplication. Fujikawa & Morozumi (2006) carried out the modeling of *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. They found that the rate of toxin production linearly increased at temperatures between 14 and 32 °C. In this study, we did not investigate enterotoxin production on cooked broccoli, however, at 20 °C, *S. aureus* reached the concentration of 5 log CFU/g after 12 h, at 30 °C after 3.5 h, while at 37 °C in only 2.7h (Figure 1). This quantity of cells can produce the sufficient enterotoxin for causing foodborne disease.

The comparison of the results demonstrated that the growth rates generated by microbiological experiments and DMFit were very similar to the growth rates modeled by ComBase. Lag phases were smaller on broccoli experiments than in ComBase at 20 and 30 °C and bigger at 10 °C (double). These differences can be explained because ComBase considers growth of *S. aureus* in broth culture, while our data were generated

using a pool of *S. aureus* on broccoli. Another possibility is that *S. aureus* are well adapted to growth on broccoli at 20 and 30 °C.

The data obtained in primary model (value of  $\mu$  and  $\lambda$ ) were used to elaborate a secondary model (Table 2), which allowed the prediction of the parameter (growth rate and lag time) described on the basis of the temperature variation. The developed models were able to assess the growth of *S. aureus* on broccoli under various temperatures, ranging from 10 to 37 °C. It can be observed that there is a good fit between the experimental data and the secondary model, because the coefficient of determination ( $R^2$ ) is close to 1, showing the precision of our model. Besides that, the small value of RMSE indicates that this model has a good fit. Based on these results, our model is adequate for modeling the growth of *S. aureus* on heat treated broccoli florets under various temperatures.

#### 4 Conclusion

The model for *S. aureus* growth on heat treated broccoli florets can be used to predict the safety of broccoli exposed to temperatures varying from 10 to 37 °C. Observed growth rates of *S. aureus* were near to predicted values from ComBase predictor under similar pH and water activity. The generated model may provide a fast and cost-effective alternative to estimate the effects of distribution temperature of *S. aureus* on ready to eat broccoli.

#### Acknowledgements

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

FAURGS (Fundação de Apoio da Universidade do Rio Grande do Sul)

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico)

#### References

- Baranyi, J.; Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.

Brasil (2016). Surtos de DTA Brasil, de 2000 a 2016. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos, Brasília, Brasil.

Brasil (2004). Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.

Buzrul, S., Alpas, H. (2004). Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study. *FEMS Microbiology Letters*, 238, 29–36.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning from a Military Unit Lunch Party — United States, July 2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 62 (50), 1026-1028.

CFS. Centre for Food Safety (2014). Microbiological Guidelines for Food For (for ready-to-eat food in general and specific food items) [Internet document] URL [http://www.cfs.gov.hk/english/food\\_leg/files/food\\_leg\\_Microbiological\\_Guidelines\\_for\\_Food\\_e.pdf](http://www.cfs.gov.hk/english/food_leg/files/food_leg_Microbiological_Guidelines_for_Food_e.pdf) Accessed 11/01/2017.

Estrada, C. S. ; Alcaráz, L. E.; Satorres, S. E.; Manfredi, E.; Velázquez, L. C., 2014. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in artisan fruit salads in the city of San Luis, Argentina. *Braz. Journal Microbiology*, 44(4), 1155-1161.

FSIS. Food Safety and Inspection Service (2012). United States Department of Agriculture. Introduction to the Microbiology of Food Processing. [Internet document] URL [https://www.fsis.usda.gov/shared/PDF/SPN\\_Guidebook\\_Microbiology.pdf](https://www.fsis.usda.gov/shared/PDF/SPN_Guidebook_Microbiology.pdf) Accesed 11.01.2017

Fujikawa, H.; Morozumi, S. (2006). Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiology*, 23(3), 260–267.

Gómez-Lobato, M. E.; Mansilla, S. A.; Cивello, P. M.; Martínez, G. A. (2014). Expression of Stay-Green encoding gene (BoSGR) during postharvest senescence of broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 95, 88–94.

Harris, L. J.; Farber, J. N. ; Beuchat, L. R.; Parish, M. E. ; Suslow, T. V.; Garrett, E. H.; Busta, F.F. (2003). Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh Cut Produce. *Comprehensive reviews in food Science and Food Safety*, 2, 78 – 141.

Ho, J.; Boost, M.; O'Donoghue, M. (2015). Sustainable reduction of nasal colonization and hand contamination with *Staphylococcus aureus* in food handlers, 2002-2011. *Epidemiology and infection*, 143, 1751-1760.

Hong, J.; Kim, Y.; Kim, J.; Heu, S.; Kim, S.-R.; Kim, K.-P; Roh, E. (2015). Genetic diversity and antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from leaf vegetables in Korea. *Journal of Food Science*, 80 (7), 1526-1531.

Kothe, C. I. K, Pessoa, J. P., Elias, S. O., Malheiros, P. S., & Tondo, E. C. (2017). Assessing the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* on fruits and vegetables exposed at 10, 20 and 30 °C. (Submitted)

Lee, Y. J.; Jung, B. S.; Kim, K. T.; Paik, H. D. (2015). Predictive model for the growth kinetics os *Staphylococcus aureus* in raw pork developed using Integrated Pathogen Modeling Program (IPMP) 2013. *Meat Science*, 107, 20-25.

Lindqvist, R.; Sylvén S.; Vagsholm, I. (2002). Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 144-170.

Marc, Y.; Valík, L.; Medvedová, A. (2009) Modelling the effect of the starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in milk. *Int J Food Microbiol.*, 129(3), 306-311.

Miles, A. A. L.; Misra, S. S. (1938). The estimation of the bacterial power of the blood. *The Journal of Hygiene*, 38(6), 732–749.

Mukherjee, S., Gangopadhyay, H., Das, D.K. (2007). Broccoli: a unique vegetable that protects mammalian hearts through the redox cycling of the thioredoxin superfamily. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 609–617.

Neter, J.; Kutner, M. H.; Nachtsheim, C. J.; Wasserman, W. (1996). *Applied Linear Regression Models*. McGraw-Hill, Chicago.

Oliviero, T.; Verkerk, R., Vermeulen, M., Dekker, M. (2014) In vivo formation and bioavailability of isothiocyanates from glucosinolates in broccoli as affected by processing conditions. *Mol Nutr Food Res.*, 58(7), 1447-1456.

Peng, J., Tang, J., Barrett,D. M., Sablani, S. S., Anderson, N., Powers, J. R. (2015). Thermal Pasteurization of Vegetables: Critical Factors for Process Design and Effects on Quality, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

Pollack, S. (2001) *Consumer Demand for Fruit and Vegetables: The U.S. Example: Economic Research Service*. Washington, DC, USA: United States Department of Agriculture.

Ratkowsky, D. A.; Ollei, J. McMeekin, T. A. ; Ball, A. (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*, 149 (1), 1-5.

Saccol, A. L. F.; Giacomelli, S. C.; Mesquita, M. O.; Castro, A. K. F.; Silva, E. A.; Hecktheuer, L. H. R. (2015). Sanitary legislation governing Food Services in Brazil. *Food Control*, 52, 27–33.

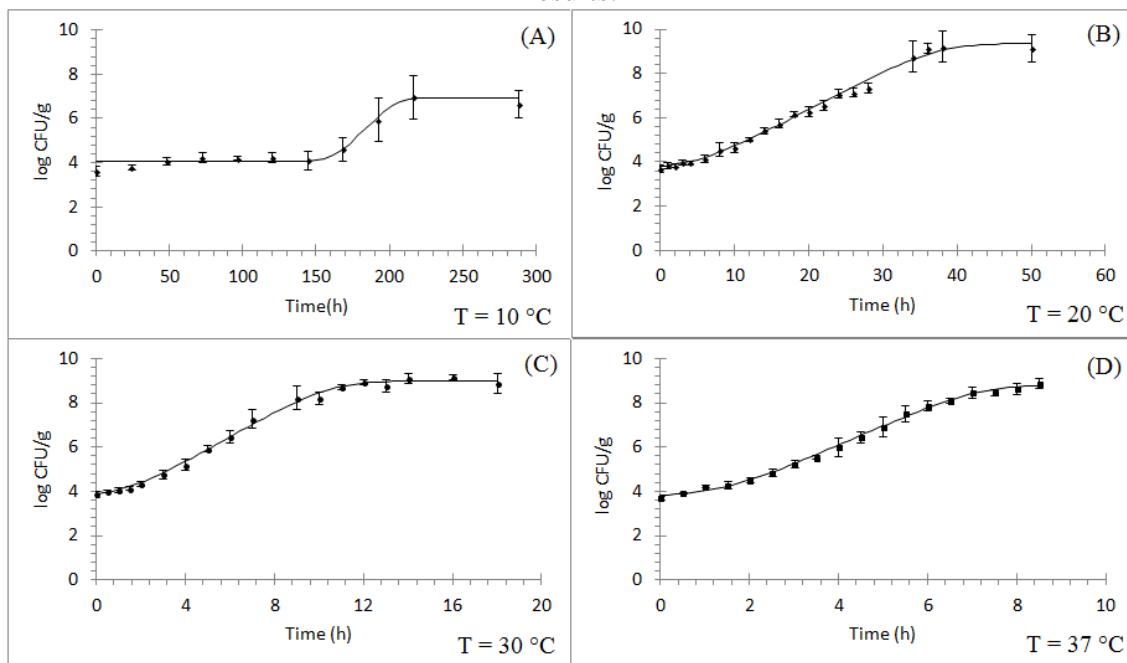
Seo, Y.-H.; Jang, J.-H.; Moon, K.-D. (2010). Occurrence and characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from minimally processed vegetables and sprouts in Korea. *Food Science and Biotechnology*, 19(2), 313-319.

Slavin, J. L.; Lloyd, B. (2012). Health Benefits of Fruits and Vegetables. Advances in Nutrition, 3, 506-516.

Tian, J.; Bae, Y. M.; Choi, N. Y.; Kang, D. H.; Heu, S.; Lee, S. Y. (2012). Survival and Growth of Foodborne Pathogens in Minimally Processed Vegetables at 4 and 15 °C. *Journal of Food Science*, 71(1), 48-50.

Wu, X.; Su, Y. C. (2014). Growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin production in pre-cooked tuna meat. *Food Control*, 42, 63-70.

**Figure 1:** Growth of *S. aureus* in broccoli stored at 10°C (A) 20°C (B) 30°C (C) and 37°C (D), fitting data to DMFit/ ComBase. Each spot represents a mean of duplicate results.



**Table 1:** Growth kinetic parameters of *S. aureus* on broccoli compared to ComBase Predictive Models at different temperatures.

Growth Parameters	Model	Temperature (°C)			
		10	20	30	37
$\mu_{\max}$	Broccoli	0.07±0.02	0.18±0.01	0.56±0.04	0.88±0.03
$\lambda$		160.93±6.68	5.30±1.03	1.45±0.46	1.43±0.14
FP		6.91±0.18	9.37±0.16	8.99±0.09	8.81±0.09
$\mu_{\max}$	ComBase ( <i>S. aureus</i> )	0.02±0.01	0.21±0.01	0.62±0.01	-*
$\lambda$		80.29±0.66	9.37±0.05	3.19±0.02	-
FP		8.07±0.02	8.09±0.01	8.08±0.01	-

\*ComBase not fit the growth parameters at 37 °C.

$\mu_{\max}$  = exponential growth rate (log CFU/g/h);  $\lambda$  = lag time (h); FP = final population (log CFU/g).

**Table 2:** Secondary model represented by square root equation, showing the growth rate and lag time in function of temperature of *S. aureus* on broccoli and calculated from ComBase.

	<b>Secondary model</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>RMSE</b>
<b>Broccoli</b>	$\sqrt{(\mu)} = 0.026 (T - 1.58)$	0.98	0.04
	$\sqrt{(\lambda)} = -0.458 (T - 36.66)$	0.94	0.95
<b>ComBase</b>	$\sqrt{(\mu)} = 0.032 (T - 5.72)$	0.99	0.01
<b>(S. aureus)</b>	$\sqrt{(\lambda)} = -0.358 (T - 32.88)$	0.88	0.94

$\mu$  = growth rate (log CFU/g/h);  $\lambda$  = lag time (h); T = temperature (°C); R<sup>2</sup> = coefficient of determination; RMSE = root mean square error.

## 5 DISCUSSÃO GERAL

Apesar da crescente associação de frutas e vegetais com surtos de DTA, nos últimos anos, poucos estudos têm se concentrado na previsão da multiplicação de micro-organismos nesses alimentos (SANT'ANA et al., 2012, TIAN et al., 2012, PUERTA-GOMEZ et al., 2013, DANYLUK et al., 2014, PARK et al., 2014, LIKOTRAFITI et al., 2014). Dentre as bactérias indicadoras encontradas em frutas e vegetais estão *E. coli* e *S. aureus* (SILVA et al., 2014; TAN et al., 2014). Tendo em vista que essas bactérias estão frequentemente presentes no ambiente e em manipuladores de alimentos de serviços de alimentação e indústrias de alimentos é importante conhecer seus comportamentos para evitar a multiplicação em alimentos e prevenir DTA.

Para isso, neste trabalho, primeiramente foi elaborado um questionário composto por três perguntas abertas para identificar as frutas e vegetais frequentemente servidos em 50 restaurantes comerciais, na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. O questionário foi composto de perguntas sobre o número de refeições diárias, quais eram as frutas e vegetais mais frequentemente servidos em *buffets* e quantas vezes por semana esses alimentos eram servidos/distribuídos. Entre os restaurantes visitados, 34,0 % serviam até 150 refeições diárias, 38,3 % entre 150 e 300 e 27,7 % mais de 300 refeições diárias. Considerando a frequência máxima de 5 dias por semana, a frequência de distribuição de frutas e vegetais nos serviços de alimentação avaliada foi em média de 4 dias por semana. As frutas e vegetais mais servidos nos *buffets* foram: pepino ( $3,61 \pm 1,45$  dias), repolho verde ( $3,96 \pm 1,33$  dias), brócolis cozido ( $4,06 \pm 1,20$  dias), melancia ( $4,21 \pm 1,32$  dias), cenoura ralada ( $4,31 \pm 1,16$  dias), mamão ( $4,67 \pm 0,88$  dias) e tomate ( $4,91 \pm 0,41$  dias). Por esta razão, estes alimentos foram avaliados no presente estudo.

Os alimentos selecionados, nesse primeiro momento, foram submetidos a temperaturas de abuso observadas nos serviços de alimentação (10, 20 e 30 °C) em um período de 24 h. Foram avaliados os tempos 0 h, 2 h, 4 h, 6 h – simulando o tempo máximo de exposição destes alimentos em um *buffet*, segundo Brasil (2004) – e ainda 24 h, para analisar se haveria perigos microbiológicos para o consumidor, considerando um cenário mais crítico de reaproveitamento.

Segundo legislação nacional (RDC 216/2004) e do Rio Grande do Sul (Portaria 78/2009), para conservação sob refrigeração, os alimentos devem ser conservados a temperaturas inferiores a 5 °C. No entanto, muitos serviços de alimentação afirmam que

é difícil seguir a temperatura permitida pela legislação (FRANTZ et al., 2008; ALVES & UENO, 2010). Em contra partida, a legislação de São Paulo (Portaria CVS 5, 2013) é mais flexível em seus parâmetros: os alimentos expostos para o consumo imediato distribuídos a 10 °C podem permanecer em *buffets* por até 4h. Neste sentido, o presente estudo corrobora com a legislação de São Paulo, pois a partir das análises microbiológicas realizadas, os resultados indicaram que *S. aureus* e *E. coli* não se multiplicaram em nenhuma das frutas e vegetais avaliados armazenados a 10 °C no período de até 6 h. Outros autores também encontraram parâmetros de tempo e temperatura mais flexíveis para diferentes preparações de alimentos e/ou diferentes micro-organismos. Park et al. (2014) demonstraram que não houve multiplicação de *S. aureus* durante 34 h em salada de abóbora doce incubada a 15 °C. Também, no estudo de Likotrafiti et al. (2013), *Listeria monocytogenes*, uma bactéria Gram-positiva, não se multiplicou em pepino, por 24 h, a 10 °C. Já no estudo de Likotrafiti et al. (2014), foi analisado o comportamento de *E. coli* O157:H7 em pepino, alface e salsa a 10 °C e não foi encontrada multiplicação deste micro-organismo em 24 h.

A legislação de São Paulo (Portaria CVS 5, 2013) também indica que alimentos frios com temperaturas entre 10 – 21 °C podem permanecer no *buffet* por no máximo 2 h de exposição. Embora demonstrado neste estudo que a *E. coli* inoculada no mamão, pepino, melancia e brócolis pode se multiplicar em 4 h a 20 °C, o presente trabalho também demonstrou que nesta temperatura houve multiplicação de *S. aureus* ( $p<0,05$ ) em menos de 2 h em brócolis cozido; contradizendo a legislação paulista, pois não seria adequado manter esse alimento próximo a temperaturas de 20 °C no tempo analisado.

Considerando a realidade climática nacional, a qual pode possibilitar que frutas e vegetais possam ser expostos a altas temperaturas, verificou-se o comportamento dos micro-organismos de interesse inoculados nos alimentos mantidos a 30 °C. Nessas condições, mamão, pepino, melancia e brócolis proporcionaram a multiplicação da *E. coli* em menos de 2 h. Por outro lado, o único alimento que suportou a multiplicação de *S. aureus*, em menos de 2 h, foi o brócolis cozido. Isso pode ser explicado em razão de o brócolis apresentar pH mais próximo da neutralidade (6,71), provavelmente favorecendo a multiplicação de *S. aureus*. Outro fator que pode ter contribuído com este resultado é o fato de que este alimento foi cozido, o que pode ter propiciado a eliminação da microbiota concorrente e liberação de nutrientes do brócolis, ficando, assim, mais suscetível para a multiplicação de *S. aureus*.

Com base nos resultados da presente dissertação, frutas e verduras mantidas a 10 °C não demonstraram multiplicação de *S. aureus* e *E. coli*, sugerindo que os alimentos mantidos até esta temperatura seriam conservados seguros, pelo menos, considerando os micro-organismos analisados, pelo menos, durante o período de distribuição (6 h). Por outro lado, os resultados demonstraram que *S. aureus* e *E. coli* foram capazes de se multiplicar em menos de 2 h a 20 e 30 °C em algumas frutas e vegetais avaliados, indicando que o ideal para manutenção da segurança dos alimentos é que não sejam expostos a estas temperaturas.

Para contemplar mais informações sobre a capacidade de multiplicação de *S. aureus* e *E. coli* nos alimentos analisados, foram calculados seus potenciais de multiplicação ( $\alpha$ ). Essa metodologia foi descrita por Sant'Ana et al. (2013), onde o potencial de multiplicação ( $\alpha$ ) dos patógenos é estimado, calculando a diferença entre as contagens 24 e 0 h. Sendo assim, neste trabalho, *S. aureus* e *E. coli* não foram considerados capazes de se multiplicar em alimentos quando o valor  $\alpha$  foi negativo ou menor que 0,5 log. Portanto, a 10 °C em 24 h, o potencial de multiplicação de *E. coli* só foi demonstrado em mamão e melancia ( $\alpha > 0,5$  log). Comparando ambos os micro-organismos, *E. coli* demonstrou maior potencial de multiplicação do que *S. aureus* em todas as frutas e vegetais analisados. No entanto, no brócolis foi observado um elevado potencial de multiplicação de *S. aureus* ( $\alpha = 4,38$  a 20 °C e  $\alpha = 5,68$  a 30 °C). Como já relatado neste estudo, a multiplicação no brócolis foi provavelmente influenciada pelo tratamento térmico.

Apesar do *S. aureus* não ter se multiplicado no tomate em nenhuma temperatura avaliada, *E. coli* demonstrou um elevado potencial de multiplicação a 20 °C ( $\alpha = 4,80$ ) e 30 °C ( $\alpha = 6,43$ ), mesmo com o baixo pH deste alimento (4,21). Além disso, o tomate foi a salada mais frequentemente servida nos restaurantes avaliados (n=50). Por isso, foi considerado importante avaliar mais criticamente o comportamento da *E. coli* neste alimento, através da geração de modelos preditivos primário e secundário.

Para obtenção do modelo primário, as curvas de multiplicação de *E. coli* em tomates expostos a 10, 20, 30 e 37 °C foram elaboradas a partir de experimentos laboratoriais. O tempo para atingir a fase estacionária nessas curvas variou de acordo com o tempo de armazenamento (Artigo 2, Figura 1). Tempos semelhantes foram encontrados para alcançar a fase estacionária em um estudo com *E. coli* em folhas de espinafre às mesmas temperaturas (Puerta-Gomez et al., 2013). As curvas de

multiplicação de *E. coli* no tomate atingiram uma concentração final de 7,0-8,0 log UFC/g em todas as temperaturas avaliadas neste estudo. Para o *ComBase Predictor* (*software* baseado em dados para prever o crescimento de micro-organismos através do pH e  $a_w$ ), a população final em todas as temperaturas foi maior (cerca de 8,7 log UFC/g). Em contraste, Puerta-Gomez et al. (2013) estudaram a multiplicação de *E. coli* em folhas de espinafre e demonstraram que a população final após atingir a fase estacionária era menor nas temperaturas mais baixas. Por outro lado, um estudo analisou a multiplicação de *E. coli* O157:H7 em alface *iceberg* e a densidade populacional máxima não variou muito de 10 a 25 °C, mas obtiveram um valor mais baixo em relação a este estudo (Koseki & Isobe, 2005). As diferenças na concentração final de *E. coli* nestes alimentos podem ter ocorrido devido à disponibilidade de nutrientes ser diferente. Embora o pH do tomate seja baixo, provavelmente os carboidratos ou proteínas presentes neste alimento são mais acessíveis do que nos vegetais folhosos (alface e espinafre), proporcionando maior condição para a multiplicação de *E. coli*. Além disso, as curvas de multiplicação do *pool* de *E. coli* inoculado em tomate neste experimento apresentaram diferentes fases *lag* e taxa de multiplicação em cada temperatura avaliada. A fase *lag* foi maior em temperaturas mais baixas, enquanto a taxa de multiplicação foi menor. Koseki & Isobe (2005) analisaram a multiplicação de *E. coli* O157:H7 em alface *iceberg* e encontraram menores tempos de fase *lag* e taxas de multiplicação similares. Em pesquisa realizada pela FDA (2015), também foi documentado tempos de fase *lag* mais curtos para *Salmonella* em tomate romo e em tomate coração de boi cortados e mantidos a 22,2 °C. No mesmo estudo, as taxas de multiplicação para ambos os tomates analisados (romo e coração de boi) foram similares aos resultados apresentados no presente estudo. No entanto, o *software* *ComBase* previu taxas de multiplicação mais lentas e fases *lag* mais elevadas do que as observadas neste estudo e com os estudos comparativos (Kosebi & Isobe, 2005; FDA, 2015). Isso pode ter ocorrido, pois o *software* considera a multiplicação de *E. coli* em caldo nutritivo, enquanto nossos resultados e de outros autores foram gerados através de tipos específicos de alimentos (tomate/ alface).

A partir dos dados obtidos no modelo primário, foi elaborado um modelo secundário, que permitiu a predição da taxa de multiplicação e do tempo de fase *lag* em variação da temperatura. Os modelos desenvolvidos foram capazes de avaliar a multiplicação de *E. coli* em tomate sob várias temperaturas, variando de 10 a 37 °C.

Pode-se observar que houve um bom ajuste entre os dados experimentais e o modelo secundário, pois o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi próximo de 1, mostrando a precisão do nosso modelo. Além disso, o pequeno valor de RMSE indicou que este modelo tem um bom ajuste. Com base nesses resultados, nosso modelo foi adequado para modelar a multiplicação de *E. coli* em tomate sob várias condições de temperatura.

Além da microbiologia preditiva, uma empresa multinacional de serviços de alimentação forneceu dados sobre as temperaturas de distribuição da cadeia fria de saladas de seus restaurantes no Brasil. Entre as saladas, o tomate foi identificado como o alimento mais consumido e, portanto, foi selecionado para avaliar suas temperaturas de distribuição. Foram avaliadas temperaturas de distribuição do tomate de 3 regiões: Sul, Sudeste e Norte / Nordeste. Os valores médios das temperaturas de distribuição de tomate coletados em serviços de alimentação variaram de 9,27 a 11,18 °C nas regiões avaliadas, ficando acima do permitido pela legislação nacional (<5 °C) (RDC 216/2004). No entanto, os valores máximos alcançaram temperaturas ainda mais extremas: de 22,30 a 29,30 °C. O Sudeste foi a região com os valores de temperatura de distribuição mais elevados, provavelmente devido a legislação paulista (São Paulo, 2013). Como mencionado anteriormente, esta legislação fornece parâmetros específicos e mais flexíveis de tempo e temperatura na distribuição de alimentos.

A partir da coleta dos dados, foram criados três cenários de maior risco (temperaturas máximas obtidas em cada região) para fazer uma simulação real da taxa de multiplicação ( $\mu$ ) e do tempo de fase *lag* ( $\lambda$ ) em função da temperatura de distribuição da cadeia do tomate nos serviços de alimentação. Deste modo, os modelos de tomate gerados foram utilizados para avaliar o risco de multiplicação de *E. coli* nos cenários propostos. O cenário mais crítico foi referente à temperatura máxima encontrada na distribuição do tomate na região Sudeste ( $T = 29,3$  °C). Aplicando esta temperatura no modelo preditivo gerado neste estudo a partir de experimentos com tomate, a taxa de multiplicação neste cenário foi a mais rápida (0,70 log UFC/g/h), enquanto a fase *lag* foi a mais baixa (1,58 h). Entretanto, como a distribuição geralmente ocorre rapidamente, não é comum ocorrer surtos alimentares em serviços de alimentação, provavelmente porque não há tempo para a multiplicação de patógenos. Apesar disso, recomenda-se evitar essas temperaturas máximas abusivas encontradas nos registros dos serviços de alimentação no Brasil, visto que haverá multiplicação de patógenos em pouco tempo de exposição dos alimentos.

De acordo com a primeira fase deste estudo, o brócolis cozido é frequentemente servido como salada ( $4,06 \pm 1,20$  dias) nos restaurantes comerciais avaliados (n=50). Além disso, foi constatado elevado potencial de multiplicação de *S. aureus* neste alimento. Deste modo, foi considerado importante a susceptibilidade de multiplicação deste micro-organismo no brócolis tratado termicamente e, por isso, também foi realizada a modelagem preditiva para multiplicação de *S. aureus* neste vegetal.

As curvas de multiplicação de *S. aureus* em brócolis expostos a 10, 20, 30 e 37 °C foram elaboradas a partir de experimentos laboratoriais. O tempo para atingir a fase estacionária e a população máxima nessas curvas variou de acordo com o tempo de armazenamento (Artigo 3, Figura 1). Pode-se observar que a temperatura teve uma influência considerável sobre o comportamento microbiano, pois a concentração final de *S. aureus* a 10 °C foi a mais baixa. Tian et al. (2012) avaliaram a multiplicação de *S. aureus* em brotos e obtiveram resultados semelhantes aos encontrados neste estudo. A bactéria avaliada se multiplicou 3 log UFC/g em brotos em 7 dias de armazenamento a 15 °C no estudo comparativo, enquanto que no brócolis se multiplicou 3,5 log UFC/g em 12 dias a 10 °C.

No presente trabalho, seguindo na construção dos parâmetros de multiplicação, a fase *lag* foi maior em temperaturas mais baixas e a taxa de multiplicação aumentou à medida que a temperatura aumentou (Artigo 3, Tabela 1). Outros estudos avaliaram a multiplicação de *S. aureus* com alimentos de origem animal, que são considerados de maior risco. No entanto, Lee et al. (2015) avaliaram a multiplicação de *S. aureus* em carne de porco crua e os resultados foram semelhantes aos obtidos neste estudo. Ainda, Wu & Su (2014) estudaram o crescimento de *S. aureus* em carne de atum pré-cozida e encontraram contagens menores para este patógeno a 37 °C comparando com os nossos resultados, mostrando que o brócolis é um alimento de grande risco para segurança dos alimentos assim como produtos de origem animal. Além disso, o software *ComBase* previu taxas de multiplicação mais lentas e fases *lag* mais elevadas do que as observadas neste estudo. Essa diferença pode ter ocorrido, pois o software considera a multiplicação de *S. aureus* em caldo nutritivo, enquanto que nossos dados foram gerados usando um *pool* de *S. aureus* e uma preparação específica de alimento (brócolis). Por outro lado, Marc et al. (2009) avaliaram o crescimento de *S. aureus* no leite e encontraram menor tempo de fase *lag* a 25 °C (1,2 h) e maior taxa de multiplicação (0,90 log UFC/g/ h). Os diferentes valores de *S. aureus* no leite são

explicados devido a este alimento ser mais rico em nutrientes favorecendo a sua multiplicação.

Assim como na modelagem preditiva do tomate, os dados obtidos no modelo primário (valor de  $\mu$  e  $\lambda$ ) foram utilizados para elaborar um modelo secundário, que também demonstrou um bom ajuste com os dados experimentais. Deste modo, com base nestes resultados, o modelo gerado neste estudo é adequado para modelar a multiplicação de *S. aureus* em brócolis tratados termicamente sob várias condições de temperatura e também pode ser adequado para prever a multiplicação de *S. aureus* em outras frutas e vegetais semelhantes.

## 6 CONCLUSÃO

Esta pesquisa demonstrou que pepino, repolho verde, brócolis cozido, melancia, cenoura ralada, mamão e tomate são frutas e vegetais frequentemente encontrados em restaurantes comerciais do Sul do Brasil. Estudos para entender o comportamento de *S. aureus* e *E. coli* demonstraram que não houve multiplicação desses micro-organismos nesses alimentos expostos a 10 °C, durante 6 h. Quando mantidos a 20 °C, *S. aureus* foi capaz de se multiplicar somente após 24 h em brócolis cozido, pepino, melancia e mamão, enquanto *E. coli* precisou de apenas 4 h para iniciar a fase *log* nestes mesmos alimentos. Quando as frutas e vegetais foram estocados a 30 °C, tanto *S. aureus* quanto *E. coli* iniciaram a multiplicação após 2 h. Assim, sugere-se que as frutas e vegetais não sejam mantidos mais de 2 h em temperatura ambiente, devendo ser distribuídos sob temperaturas de refrigeração (no mínimo  $\leq 10$  °C) para prevenir a multiplicação dos micro-organismos estudados.

Dos alimentos avaliados, o tomate foi o mais frequentemente servido nos restaurantes comerciais avaliados e houve multiplicação significativa de *E. coli* sobre esse alimento. Foi desenvolvido um modelo secundário para prever a multiplicação de *E. coli* em tomate, o qual pode ser utilizado para avaliar a segurança desse alimento em temperaturas, variando de 10-37 °C. Aplicando o modelo gerado, foi observado que *E. coli* é capaz de se multiplicar em tomate em 1,58 h a 29,3 °C, temperatura mais crítica encontrada na cadeia de distribuição do tomate, a qual deve ser evitada.

*S. aureus* apresentou grande potencial de multiplicação em brócolis cozido e, por isso, foi desenvolvido um modelo secundário para esse alimento. O modelo pode

fornecer uma alternativa rápida e econômica para estimar os efeitos da temperatura (10-37 °C) de armazenamento e distribuição na multiplicação de *S. aureus* em brócolis, contribuindo para a segurança desse alimento.

Assim, os resultados obtidos nesta pesquisa podem ser utilizados na gestão de segurança de alimentos afim de estabelecer os requisitos de tempo/temperatura para as frutas e vegetais prontos para consumo, em serviços de alimentação. A modelagem preditiva realizada para o tomate e para o brócolis cozido podem fornecer uma base científica para estabelecer novos e melhores procedimentos. Esta abordagem pode ser também uma sugestão para que os gestores da segurança dos alimentos definam melhor as medidas de controle a serem adotadas nos serviços de alimentação, de modo a prevenir as DTA, transmitidas através das frutas e vegetais.

## 7 REFERÊNCIAS

- AL-KHAROUSI, Z. S. et al. Hiding in Fresh Fruits and Vegetables: Opportunistic Pathogens May Cross Geographical Barriers. **International Journal of Microbiology**, v. 2016, p. 1-14, 2016.
- ALVES, M. G.; UENO M., Restaurantes *self-service*: segurança e qualidade sanitária dos alimentos servidos: **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 573-580, 2010.
- ANVISA. **Cartilha sobre Boas Práticas para Serviços de Alimentação**. Brasília, 2008. Disponível em: <[http://saude.es.gov.br/Media/sesa/NEVS/Alimentos/cartilha\\_gicra\\_final.pdf](http://saude.es.gov.br/Media/sesa/NEVS/Alimentos/cartilha_gicra_final.pdf)>. Acesso em: 26 julho 2015.
- ARTÉS, F. et al. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51, n. 3, p. 287–296, 2009.
- BERNARDO, G. L. et al. Assessment of the healthy dietary diversity of a main meal in a self-service restaurant. **British Food Journal**, v. 117, n. 1, p. 286 – 301, 2015.
- BEZERRA, I. N. et al. Away-from-home eating: nutritional status and dietary intake among Brazilian adults. **Public Health Nutrition**, v. 18, n. 06, p. 1011-1017, 2015.
- BHARATHI, S.; RAMESH, M. N.; VARADARAJ, M. C. Predicting the behavioural pattern of *Escherichia coli* in minimally processed vegetables. **Food Control**, v. 12, n. 5, p. 275–284, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 15 set. 2004, Seção 1, p. 25.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos. 2014.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/>>. Acesso em: 26 junho 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. **Dados Surtos de DTA Brasil, de 2000 a 2016**, junho de 2016.

BUCHANAN, R. L. Identifying and Controlling Emerging Foodborne Pathogens: Research Needs. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 517-521, 1997.

CARRASCO, E.; MORALES-RUEDA, A.; GARCÍA-GIMENO, R. M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 545–556, 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne-disease outbreaks - United States, 1993-1997. Appendix B - **Guidelines for confirmation of foodborne-disease outbreaks**, v. 49, p. 54-62, 2000.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Diseases Transmitted through the Food Supply. **Pathogens Transmitted by Food Contaminated by Infected Persons Who Handle Food, and Modes of Transmission of Such Pathogens, 2014.** Disponível em <<https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/pathogens-by-food-handlers-508c.pdf>>. Acesso em: 29 dezembro 2016.

DABLOOL; AL-GHAMDI, S. S. Enterotoxicogenicity of *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Handlers during Hajj Season in Saudi Arabia. **Journal of Safety Science and Technology**, v. 1, p. 75-78, 2011.

DANYLUK, M. D.; FRIEDRICH, L. M.; SCHAFFNER, D. W. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* on cut cantaloupe, honeydew and watermelon. **Food Microbiol.**, v. 38, p. 52-55, 2014.

ESTRADA, C. S. et al. Presence of enterotoxicogenic *Staphylococcus aureus* in artisan fruit salads in the city of San Luis, Argentina. **Braz. Journal Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1155-1161, 2014.

FETSCH, A. et al. *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, p. 1–6, 2014.

FDA. Food and Drug Administration. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook “Bad Bug Book”.** Second Edition. *Staphylococcus aureus*, p. 87-91, 2012.

FDA. Food and Drug Administration. **Program information manual retail food protection—storage and handling of tomatoes**, 2015. Disponível em:

<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/IndustryandRegulatoryAssistanceandTrainingResources/ucm113843.htm>. Acesso 5 de Janeiro de 2017.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; JINNEMAN, K. Bacteriological Analytical Manual. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Food and Drug Administration - FDA**, 2011.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2<sup>a</sup> edição, 424p, 2013.

FRANTZ, C. B. et al. Avaliação de registros de processos de quinze unidades de alimentação e nutrição. **Alim. Nutr.**, v. 19, n. 2, p. 167-175, 2008.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. Barueri, SP: Manole, 4<sup>a</sup> edição, 986p., 2011.

HABERBECK, L. U. **Modelagem da inativação isotérmica e não isotérmica de *Bacillus coagulans* por tratamento termoquímico utilizando óleo essencial de orégano**. 105 p. 2011. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis.

HERRERA, C. F. et al. Effect of Good Hygiene Practices Implementation in the Milk Sanitary Quality Used in the Cotija Cheese Elaboration. **Advances in Bioresearch**, v. 5, n. 4, p. 39-44, 2014.

HO, J.; BOOST, M.; O'DONOOGHUE, M. Sustainable reduction of nasal colonization and hand contamination with *Staphylococcus aureus* in food handlers, 2002-2011. **Epidemiology and infection**, v. 143, p. 1751-1760, 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008/2009 - Brasil e grandes regiões**. Rio de Janeiro: IBGE; 2010.

KAJAK, K.ç KRAJEWSKA, D. K. Construction of predictive models of growth of microorganisms in salted and cured meat products. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 7, p. 152-159, 2006.

KOSEKI, S; ISOBE, S. Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 239-248, 2005.

LAIDLER, M. R. et al. *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of locally grown strawberries contaminated by deer. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57(8), p. 1129-1134, 2013.

LAMBRECHTS A. A. et al. Bacterial contamination of the hands of food handlers as indicator of hand washing efficacy in some convenient food industries in South Africa. **Pakistan Journal of Medical Science**, v. 30, n. 4, p. 755–758, 2014.

LEAL, D. Crescimento da alimentação fora do domicílio. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 17, n. 1, p. 123-132, 2010.

LEE, Y. J.; JUNG, B. S.; KIM, K. T.; PAIK, H. D. Predictive model for the growth kinetics of *Staphylococcus aureus* in raw pork developed using Integrated Pathogen Modeling Program (IPMP) 2013. **Meat Science**, v. 107, p. 20-25, 2015.

LEFF, J. W.; FIERER, N. Bacterial Communities Associated with the Surfaces of Fresh Fruits and Vegetables. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. 1-9, 2013.

LIKOTRAFITI, E.; SMIRNIOTIS, P.; NASTOU, A.; RHOADES, J. Effect of Relative Humidity and Storage Temperature on the Behavior of *Listeria monocytogenes* on Fresh Vegetables. **Journal of Food Research**, v. 33, n. 4, p. 545-551, 2013.

LIKOTRAFITI, E.; ANAGNOU, M.; LAMPIRI, P.; RHOADES, J. Effect of Storage Temperature on the Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium on Salad Vegetables. **Journal of Food Research**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2014.

LIU, H.; WAHL, T. I.; JR SEALE, J. L.; BAI, J. Household composition, income, and food-away-from-home expenditure in urban China. **Food Policy**, v. 51, p. 97–103, 2015.

MADAPPA, T. *Escherichia Coli Infections Differential Diagnoses*, 2016. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/217485-differential>>. Acesso em: 15 janeiro 2016.

MARC, Y.; VALÍK, L.; MEDVEDOVÁ, A. Modelling the effect of the starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 3, p. 306-311, 2009.

MARKS, B. P. Status of Microbial Modeling in Food Process Models. Comprehensive Reviews. **Food Science and Food Safety**, v. 7, p. 137-143, 2008.

McDONALD, K., SUN, D.W. Predictive food microbiology for the meat industry: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, p. 1-27, 1999.

McKELLAR R.; LU X.; DELAQUIS P. J. A probability model describing the interface between survival and death of *Escherichia coli* O157:H7 in a mayonnaise model system. **Food Microbiology**, v. 19, p. 235–247, 2002.

McMEEKIN, T. A., OLLEY, J., RATKOWSKY, D. A., ROSS, T. Predictive microbiology: Towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 395- 407, 2002.

McMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Shelf life prediction: status and future possibilities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 65-83, 1996.

MILLER, M.; REICKS, M.; REDDEN, J. P.; MANN, T.; MYKEREZI, E.; VICKERS, Z. Increasing portion sizes of fruits and vegetables in an elementary school lunch program can increase fruit and vegetable consumption. **Appetite**, v. 91, p. 426-430, 2015.

MULLER, M. I. **Boas práticas de manipulação de alimentos com merendeiras.** 49 p. 2011. Monografia (Especialização em Microbiologia Industrial e de Alimentos). Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC, Joaçaba.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 41-51, 2000.

OLIVEIRA, A. P. et al. Microbiologia Preditiva. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 9, n. 17; p. 1909, 2013.

PARK, A., HWANG, I.-G., LEE, S.-H., CHO, J.-I., LEE, S., LEE, H., YOON, Y. Predictive Models to Describe Behavior of *Staphylococcus aureus* in Sweet Pumpkin Salad Under Constant and Dynamic Temperature. **Journal of Food Safety**, v. 34, p. 257–262, 2014.

PBH. Produce for Better Health Foundation. (2015). Study on America's Consumption. *State of the Plate*. Disponível em: <<http://www.pbhfoundation.org>>. Acesso em 27 julho 2016.

PUERTA-GOMEZ, A. F. et al. Modeling the growth rates of *Escherichia coli* spp. and *Salmonella* Typhimurium LT2 in baby spinach leaves under slow cooling. **Food Control**, v. 29, p. 11-17, 2013.

RAPINI, L.S. et al. Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 825-829, 2005.

RATKOWSKY, D. A. et al. Relationship between temperature and growth rate pf bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 149, p. 1-5, 1982.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. Portaria **Estadual 78, de 30 de janeiro de 2009**. Estabelece os procedimentos de Boas Práticas para Serviços de Alimentação, a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado.

RODRIGUES, T. S.; ARAÚJO, W. M. C. **Restaurantes Self-Service: Práticos e Perigosos.** 69 p. 2004. Monografia (Especialização em Centro de Excelência em Turismo) – Universidade de Brasília, Brasília.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Modeling Microbial Growth within food safety risk assessments. **Risk Analysis**, v. 23, n. 1, 2003.

SANI, N. A.; SIOW, O. N. Knowledge, attitudes and practices of food handlers on food safety in food service operations at the Universiti Kebangsaan Malaysia. **Food Control**, v. 37, p. 210-217, 2014.

SANT'ANA, A. S.; FRANCO, B. D. G. M.; SCHAFFNER, D. W. Modeling the growth rate lag time of different strains of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce. **Food Microbiology**, v. 30, p. 267-273, 2012.

SANT'ANA, A. S. et al. Growth Potential of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce and collard greens packaged under modified atmosphere and in perforated film. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 5, p. 888-891, 2013.

SÃO PAULO. Secretaria da Saúde. Centro de Vigilância Sanitária. **Portaria CVS 5, de 09 de abril de 2013**. Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação.

SHAH, A. A. et al. Multidrug-resistant diarrheagenic *E. coli* pathotypes are associated with ready-to-eat salad and vegetables in Pakistan. **Journal Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 267–273, 2015.

SILVA, M. L. Q. et al. Avaliação higiênico-sanitária dos restaurantes *self-services* e restaurantes populares da cidade de Juazeiro do Norte (CE) quanto a prevalência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus sp.* **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 2, n. 4, p. 1-5, 2014.

SOARES, A. D. N.; MONTEIRO, M. A. M.; SCHAEFER, M. A. Evaluation of the time and temperature binomial in hot meals served in a university restaurant. **Higiene Alimentar**, v. 23, p. 36-41, 2009.

STAMFORD, T. L. M. et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus spp.* isolados de leite in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 41-45, 2006.

TAN, S. L.; LEE, H. Y.; MAHYUDIN, N. A. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from food handler's hands. **Food Control**, v. 44, p. 203-207, 2014.

TIAN, J. et al. Survival and Growth of Foodborne Pathogens in Minimally Processed Vegetables at 4 and 15 °C. **J. Food Science**, v. 71, n. 1, p. 48-50, 2012.

TONDO, E.; BARTZ, S. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 263 p., 2014.

USAJEWICZ, I.; NALEPA, B. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Milk Exposed to High Temperatures and High Pressure. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 33–39, 2006.

USDA. United States Department of Agriculture. Food Consumption and Demand. **Food Away from Home, 2014**. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov>>. Acesso em: 27 junho 2015.

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. A classification of models in predictive microbiology. **Food Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 175 -177, 1993,

WHITING, R. C. Microbial modelling in foods. Critical Reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 467-494, 1995.

WHO, World Health Organization. **Five Keys to Safer Food, 2006**. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/en/>>. Acesso em: 27 junho 2015.

WOODSIDE, J. V.; YOUNG, I. S.; MCKINLEY, M. C. Fruits and vegetables: measuring intake and encouraging increased consumption. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 72, p. 236–245, 2013.

WU, X.; SU, Y. C. Growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin production in pre-cooked tuna meat. **Food Control**, v. 42, p. 63-70, 2014.

YU C., DAVIDSON V. J., YANG S. X. A neural network approach to predict survival/death and growth/no-growth interfaces for *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v. 23, p. 552–60, 2006.

ZWEIFEL, C., STEPHAN, R. Spices and herbs as source of *Salmonella*-related foodborne diseases. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 765–769, 2012.