



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.....	3
3.1	Dados sobre o consumo de alimentos fora do domicílio	3
3.2	Consumo e contaminação de frutas e vegetais	5
3.3	Legislação	5
3.4	Doenças Transmissíveis por Alimentos.....	6
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	DISCUSSÃO GERAL	15
5	CONCLUSÃO	21
6	REFERÊNCIAS.....	22

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; LAMBRESCHTS 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 devam 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. Dentre 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 lembram 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 toxi-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).

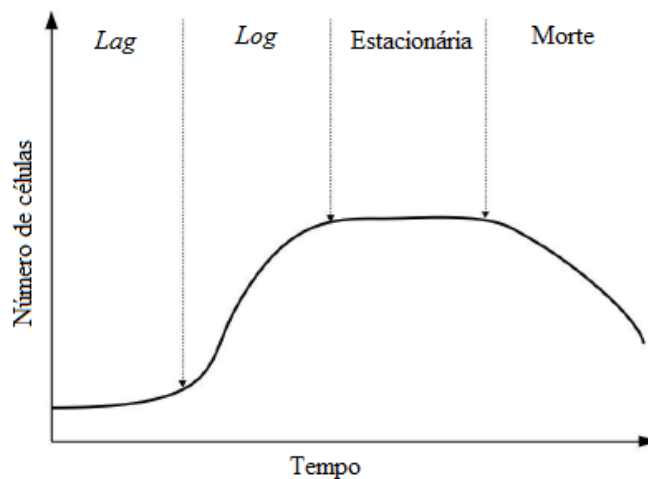


Figura 1. Curva típica de multiplicação bacteriana. Fonte: Ross & McMeekin (2003).

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 prever 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 radiche e *E. coli* em amostras de radiche, 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 formado 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, câibras 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; LAMBRESCHTS 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), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (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 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 microorganismos 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 susceptível 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 (α). Essa metodologia foi descrita por Sant'Ana et al. (2013), onde o potencial de multiplicação (α) 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 α 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 roma 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 (roma 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 nutriente, 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 (μ) e do tempo de fase *lag* (λ) 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 nutriente, 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 μ e λ) 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.

5 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 ≤ 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 a fim 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.

6 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>. 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. Enterotoxigenicity 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 enterotoxigenic *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, 2ª 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, 4ª 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'DONOGHUE, M. Sustainable reduction of nasal colonization and hand contamination with *Staphylococcus aureus* in food handlers, 2002-2011. **Epimediology 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 e 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.