

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**MODELAGEM DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE MULTIPLICAÇÃO DE
Salmonella Enteritidis SE86 EM MAIONESE CASEIRA E PRÁTICAS DE
PREPARO, ESTOCAGEM E CONSUMO DESSE ALIMENTO NO RIO
GRANDE DO SUL**

SUSANA DE OLIVEIRA ELIAS
Bacharel em Biomedicina

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Fevereiro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**MODELAGEM DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE MULTIPLICAÇÃO DE
Salmonella Enteritidis SE86 EM MAIONESE CASEIRA E PRÁTICAS DE
PREPARO, ESTOCAGEM E CONSUMO DESSE ALIMENTO NO RIO
GRANDE DO SUL**

SUSANA DE OLIVEIRA ELIAS
Bacharel em Biomedicina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente/UFRGS. Área de concentração Microbiologia de Alimentos.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Fevereiro de 2014

CIP - Catalogação na Publicação

de Oliveira Elias, Susana
MODELAGEM DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE
MULTIPLICAÇÃO DE Salmonella ENTERITIDIS SE86 EM
MAIONESE CASEIRA E PRÁTICAS DE PREPARO, ESTOCAGEM E
CONSUMO DESSE ALIMENTO NO RIO GRANDE DO SUL / Susana
de Oliveira Elias. -- 2014.
116 f.

Orientador: Eduardo César Tondo.
Coorientador: Anderson de Souza Sant'Ana.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Salmonella. 2. Maionese caseira. 3. Curvas de
crescimento. 4. Modelagem matemática preditiva. 5.
Questionário. I. César Tondo, Eduardo, orient. II.
de Souza Sant'Ana, Anderson, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por todas as bênçãos recebidas.

Aos meus pais, por todo amor, carinho e dedicação. Por sempre terem me apoiado, acreditando nos meus sonhos e me ajudando a realizá-los.

Ao Tiago, pela ajuda, paciência, carinho, dedicação e por todos os momentos de alegria e descontração.

A minhas irmãs, agradeço por todos os conselhos e exemplos de vida.

Aos meus sobrinhos, por todas as brincadeiras, risadas e questionamentos, tornando meu cotidiano mais descontraído e alegre.

Aos meus amigos e colegas, por compartilharem comigo tantos momentos felizes e inesquecíveis.

Aos professores Eduardo César Tondo e Anderson de Souza Sant'Ana que por todos ensinamentos, dedicação, confiança, incentivo e paciência, tornaram-se imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas do laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, em especial à Vera pelo carinho, amizade e conselhos. À Claudinha pela ajuda com análise estatística. À Júnia pelas contribuições relevantes na escrita desta dissertação. À Mariangela, ao Diego e à Fabi e à Elis pela ajuda na preparação dos meios de cultura e aos demais colegas agradeço pelos momentos de descontração e alegria.

À UFRGS e ao PPGMAA pela qualidade do ensino e infraestrutura adequada, proporcionando um ambiente acadêmico inspirador e de grande excelência.

Ao CNPq e à CAPES, pelo suporte financeiro, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite.

RESUMO

MODELAGEM DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE MULTIPLICAÇÃO DE *Salmonella* Enteritidis SE86 EM MAIONESE CASEIRA E PRÁTICAS DE PREPARO, ESTOCAGEM E CONSUMO DESSE ALIMENTO NO RIO GRANDE DO SUL¹

Autora: Susana de Oliveira Elias

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana

Uma cepa específica de *Salmonella* Enteritidis (SE86) tem sido identificada como o principal agente etiológico responsável pela salmonelose, no Rio Grande do Sul (RS) e o principal alimento envolvido vem sendo a maionese caseira (MC). Assim, este estudo objetivou modelar a multiplicação de SE86 na MC e estudar as práticas de preparo, estocagem e consumo de MC no RS. SE86 foi inoculada na MC e armazenada a 7, 10, 15, 20, 25, 30 e 37°C. Curvas de multiplicação foram construídas utilizando-se o DMFit de Baranyi, gerando valores de R^2 maiores que 0,98 para os modelos primários. Já o modelo secundário foi realizado por meio da equação de Ratkowsky, obtendo valores de R^2 e RMSE de 0,99 e 0,016, respectivamente. Os dados experimentais mostraram que SE86 não se multiplicou na MC a 7°C, durante 30 dias, enquanto que a 37°C alcançou-se a dose infectante (10^6 UFC/g) em 6 h e a população final (10^9 UFC/g) em 13 h. As fases *lag* de SE86 na MC foram menores que as simuladas nos modelos terciários, sugerindo que SE86 adapta-se rapidamente nesse alimento. Além disso, o questionário que avaliou as práticas adotadas por consumidores e manipuladores de MC demonstrou que a maioria dos entrevistados apresentou um nível baixo de IPShp (índice de prevenção de surto harmônico ponderado), principalmente devido a falhas relacionadas ao binômio tempo e temperatura. Em suma, o modelo desenvolvido pode ser utilizado para prever a multiplicação de SE86 na MC em várias temperaturas e MC pode ser preparada se forem utilizados ovos seguros e mantendo-a abaixo de 7°C.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia de Alimentos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (X p.) Fevereiro, 2014.

ABSTRACT

MODELING GROWTH KINETIC PARAMETERS OF *Salmonella* Enteritidis SE86 ON HOMEMADE MAYONNAISE AND PRACTICES OF PREPARATION, STORAGE AND CONSUMPTION OF THIS FOOD AT RIO GRANDE DO SUL, SOUTHERN BRAZIL²

Author: Susana de Oliveira Elias

Supervisor: Prof. Ph.D. Eduardo César Tondo

Co-supervisor: Prof. Ph.D. Anderson de Souza Sant'Ana

A specific strain of *Salmonella* Enteritidis (SE86) has been identified as the major etiological agent responsible for salmonellosis, in Rio Grande do Sul (RS) and the main food involved has been the homemade mayonnaise (HM). This study aimed to model growth of SE86 on HM and to analyze practices of preparation, storage and consumption of HM in RS. SE86 was inoculated on HM and stored at 7, 10, 15, 20, 25, 30 and 37°C. Growing curves were built by fitting data to the Baranyi's DMFit, generating R² values greater than 0.98 for primary models. Secondary model was fitted with Ratkowsky equation, generating R² and RMSE values of 0.99 and 0.016, respectively. Experimental data showed that SE86 did not grow on HM at 7°C, for 30 days, while at 37°C infective dose (10⁶ CFU) was reached at 6 h and final population (10⁹ CFU/g) was attained at 13 h. Experimental data demonstrated smaller *lag* phases than those generated by tertiary models, suggesting that SE86 is well adapted for growing on HM. In addition, the questionnaire that assessed the practices adopted by HM consumers and handlers showed that the majority of respondents had a low level of IPShp (outbreak prevention weighted harmonic index), mainly due to failures related to the combination of time and temperature. In conclusion, the developed model can be used to predict growth of SE86 on HM under various temperatures and HM can be prepared if safe eggs were used and HM were stored below 7°C.

² Master of Science dissertation in Food Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (X p.) February, 2014.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
SUMÁRIO	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO GERAL	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 <i>SALMONELLA</i> SPP.....	4
2.1.1 <i>Salmonella</i> Enteritidis SE86.....	7
2.2 OVOS E MAIONESE CASEIRA	8
2.3 MULTIPLICAÇÃO MICROBIANA.....	12
2.4 MICROBIOLOGIA PREDITIVA.....	15
2.5 ESTUDOS DE HÁBITOS ALIMENTARES.....	18
2.5.1 Boas Práticas.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 MICRO-ORGANISMO.....	21
3.2 INGREDIENTES E PREPARO DA MAIONESE CASEIRA	22
3.3 INOCULAÇÃO DE SE86 NA MAIONESE CASEIRA	23
3.4 CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ENUMERAÇÃO DE SE86 NA MAIONESE CASEIRA	24
3.5 MODELAGEM DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE MULTIPLICAÇÃO DE SE86 EM MAIONESE CASEIRA.....	25
3.6 AVALIAÇÃO DO MODELO PREDITIVO DA MAIONESE CASEIRA	26
3.7 QUESTIONÁRIO	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5 CONCLUSÕES	68
6 PERSPECTIVAS	71
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APÊNDICE 1: QUESTIONÁRIO	81
APÊNDICE 2: ARTIGO CIENTÍFICO	86
VITA	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Prevalência de <i>Salmonella</i> em ovos no Brasil. Apresenta o estudo (referência), o valor da prevalência encontrado e o local que foi realizado.	10
Tabela 2: Parâmetros utilizados para simular a multiplicação de <i>Salmonella</i> no ComBase e no PMP. Parâmetros utilizados: pH, atividade de água, nível inicial de <i>Salmonella</i> , modelo de multiplicação e temperatura.....	28
Tabela 3: Nível de conformidade das respostas às questões que compõem o índice de Boas Práticas ponderado.	33
Tabela 4: Classificação de acordo com o nível de conformidade do IBPp.....	35
Tabela 5: Questões que compõem o Índice de Prevenção de Surto ponderado e seus respectivos pesos.....	36
Tabela 6: Parâmetros cinéticos de multiplicação de <i>Salmonella</i> em maionese caseira (MC), no ComBase Predictive Model e no Pathogen Modeling Program (PMP) 7.0, em diferentes temperaturas. A 7°C, a multiplicação de SE86 na MC não foi observada. Enquanto que as temperaturas 7°C e 37°C não estavam disponíveis para simulação no PMP.	41
Tabela 7: Modelo secundário representado pela equação da raiz quadrada, que mostra a relação entre a taxa de multiplicação e a temperatura de SE86 na maionese caseira e calculada a partir dos programas de computador (ComBase e PMP), juntamente com os seus respectivos valores de R ² e de RMSE.....	49
Tabela 8: Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com: gênero, faixa etária, raça, renda familiar, escolaridade e região do Estado que reside.	50
Tabela 9: Práticas de consumo de maionese caseira, apresentando a frequência e a quantidade consumida.	52
Tabela 10: Práticas de estocagem da maionese caseira, em relação ao tempo, à temperatura e aos recipientes utilizados.....	53
Tabela 11: Práticas de estocagem das sobras de maionese caseira, em relação ao tempo, à temperatura e ao modo de reaproveitamento.	54
Tabela 12: Práticas de preparo da maionese caseira, enfatizando o uso de ovos e o aspecto da gema cozida.....	55
Tabela 13: Receitas mais frequentes de maionese caseira, segundo o questionário, comparadas à receita utilizada na modelagem preditiva, abordando: composição, pH e atividade de água.	60

Tabela 14: Número de vezes (n) que os ingredientes aparecem isoladamente na maionese caseira.	59
Tabela 15: Práticas gerais adotadas no preparo de alimentos, abordando limpeza de mãos, separação de utensílios e critério para consumo de alimento armazenado.	60
Tabela 16: Variáveis estatisticamente dependentes, segundo o teste qui-quadrado de Pearson com nível de significância de 5%.	63
Tabela 17: Distribuição dos valores do Índice de Boas Práticas ponderado, Índice de Prevenção de Surto ponderado e Índice de Prevenção de Surto harmônico e ponderado segundo os critérios: baixo, médio e alto.	65
Tabela 18: Média e desvio-padrão de cada índice calculado.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Patogênese da contaminação de ovos por *Salmonella*. Adaptado de Gantois et al. (2009). (a) *Salmonella* é ingerida pela galinha e entra no trato digestório. Essa bactéria começa a colonizar o intestino, sendo capaz de invadir as células epiteliais intestinais. Como consequência, macrófagos são atraídos para o local da invasão e internalizam *Salmonella*. Isso permite que essa bactéria sobreviva e multiplique-se dentro do macrófago, favorecendo a sua motilidade, visto que os macrófagos infectados migram para os órgãos internos, tais como os órgãos reprodutores. Além dessa disseminação sistêmica, *Salmonella* também pode colonizar o oviduto por meio de infecção ascendente da cloaca. (b) Contaminação dos ovos pela penetração de *Salmonella* através da casca e das membranas da casca após a contaminação do exterior da casca. Essa contaminação da superfície da casca pode ser o resultado de uma infecção da vagina ou contaminação fecal. (c) Contaminação direta da gema, do albúmen, das membranas da casca e da casca proveniente da infecção do oviduto. (d) Após oviposição, *Salmonella* presente no albúmen é capaz de sobreviver e se multiplicar. Essa bactéria também possui a capacidade de migrar e penetrar na gema, alcançando esse ambiente rico, pode se multiplicar expressivamente. 9

Figura 2: Curva de multiplicação microbiana dividida em suas quatro fases (Lag, Log, estacionária e morte). 12

Figura 3: Comportamento de *Salmonella* Enteritidis SE86 em maionese caseira armazenada a 7°C. Cada quadrado representa um ponto coletado, referente a um experimento em triplicata repetido 2 vezes. Todos os desvios-padrão foram menores que 0,45 log UFC/g. 39

Figura 4: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 em maionese caseira armazenada a 37°C. O modelo primário está representado pela linha, possuindo um $R^2 = 0,99$ e os quadrados são os valores experimentais. 44

Figura 5: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 em maionese caseira armazenada a 30°C. O modelo primário está representado pela linha, possuindo um $R^2 = 0,99$ e os quadrados são os valores experimentais. 45

Figura 6: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 em maionese caseira armazenada a 25°C. O modelo primário está representado pela linha, possuindo um $R^2 = 0,99$ e os quadrados são os valores experimentais. 45

Figura 7: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 em maionese caseira armazenada a 20°C. O modelo primário está representado pela linha, possuindo um $R^2 = 0,99$ e os quadrados são os valores experimentais. 46

Figura 8: Multiplicação de <i>Salmonella</i> Enteritidis SE86 em maionese caseira armazenada a 15°C. O modelo primário está representado pela linha, possuindo um R2 = 0,98 e os quadrados são os valores experimentais.	46
Figura 9: Multiplicação de <i>Salmonella</i> Enteritidis SE86 em maionese caseira armazenada a 10°C. O modelo primário está representado pela linha, possuindo um R2 = 0,98 e os quadrados são os valores experimentais.	47
Figura 10: Multiplicação de <i>Salmonella</i> Enteritidis SE86 em maionese caseira armazenada a 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 37°C ajustada aos dados do DMFit versão 2.1. As linhas representam o modelo primário. Cada símbolo representa uma média de resultados em triplicata e repetidos 2 vezes. Todos os desvios-padrão foram menores que 0,55 log UFC/g.....	48
Figura 11: Quantidade de entrevistados que utilizam determinado ingrediente na preparação da maionese caseira	57
Figura 12: Média e desvio-padrão das quantidades de cada ingrediente quando usado na maionese caseira. Barras pretas mostram quantidades em gramas, enquanto que as brancas em mililitros.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
a_w	Atividade de Água
BHI	“Brain Heart Infusion”
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention”
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
<i>ComBase</i>	<i>ComBase Predictive Model</i>
DTA	Doença Transmitida por Alimento
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
g	Grama
g	Unidade Gravitacional
h	Horas
IBPp	Índice de Boas Práticas ponderado
ICTA	Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IPB-LACEN	Laboratório Central do Estado
IPSp	Índice de Prevenção de Surto ponderado
IPShp	Índice de Prevenção de Surto harmônico ponderado
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
Log	Logaritmo
m	Massa
MC	Maionese Caseira
mL	Mililitros
min	Minutos
nm	Nanômetros
NMP	Número Mais Provável
DO	Densidade Óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
PIB	Produto Interno Bruto
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
PMP	<i>Pathogen Modeling Program</i>
ppm	Parte por Milhão
R^2	Coeficiente de Determinação
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMSE	<i>Root-mean-square error</i>
RS	<i>Rio Grande do Sul</i>
SE86	<i>Salmonella</i> Enteritidis SE86

UFRGS Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFC Unidade Formadora de Colônia
v Volume
VISA Vigilância Sanitária
XLD *Xylose Lysine Deoxycholate*

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a salmonelose humana é a doença de origem alimentar com maior ocorrência em nível mundial, sendo que *Salmonella* Enteritidis tem sido apontado como o principal causador de surtos alimentares no Brasil e no Rio Grande do Sul (RS). Muitos isolados desse patógeno, originários de centenas de surtos ocorridos no RS, foram caracterizados por análises tradicionais e moleculares, as quais permitiram a identificação de uma cepa predominante, denominada de *S. Enteritidis* SE86 (SE86).

Os ovos têm sido identificados como o principal veículo de transmissão de *S. Enteritidis* responsável por infecções em humanos. A maionese caseira (MC) preparada com ovos crus e amplamente consumida no RS tem sido identificada como o principal veículo de transmissão de salmonelose nesse Estado. Ainda que essa informação seja conhecida há muitos anos, a MC continua sendo amplamente consumida no RS e a SE86 persiste causando surtos alimentares, indicando que as medidas de controle implementadas não têm sido totalmente eficazes ou que a dinâmica da contaminação da MC necessita ser melhor estudada.

Modelos matemáticos aplicados à microbiologia preditiva têm sido utilizados para descrever e simular cinéticas da multiplicação microbiana em diversos alimentos, e podem ser usados para uma melhor compreensão da multiplicação de SE86 em MC. Porém, a utilização isolada desses modelos pode não ser suficiente para entender a contaminação de SE86 em MC no RS, uma vez que os hábitos que envolvem esse alimento são diversificados. No intuito de melhor compreender os fatores que influenciam a veiculação de SE86 por MC no RS, informações sobre as práticas de preparo, de estocagem e de consumo da MC devem ser estudadas, a fim de poder construir corretamente os modelos matemáticos de microbiologia preditiva e propor medidas de controle adequadas. Em vista disso o objetivo do presente estudo é apresentado abaixo.

1.1 Objetivo geral

Modelar os parâmetros cinéticos de multiplicação de SE86 na MC e estudar as práticas de preparo, de estocagem e de consumo desse alimento no RS.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar os parâmetros cinéticos de multiplicação (tempo de fase *lag*, taxa de multiplicação e população máxima) de SE86 na MC;
- Construir modelos primário e secundário de multiplicação de SE86 na MC;

- Validar os modelos de multiplicação obtidos nesse estudo por meio dos valores do coeficiente de determinação (R^2) e do erro quadrático médio (RMSE);
- Comparar os modelos de multiplicação obtidos nesse estudo a modelos gerados por programas (*ComBase Predictive Model* e *Pathogen Modeling Program 7.0*) e outros descritos em literatura;
- Elaborar e aplicar o questionário para coleta de informações sobre práticas de preparo, de estocagem e de consumo de MC no RS;
- Avaliar o perfil do manipulador e/ou consumidor de MC em relação às Boas Práticas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, está dividido em duas espécies (*S. enterica* e *S. bongori*) e mais de 2.600 sorotipos, todos potencialmente patogênicos (Grimont & Weill, 2007). Essa bactéria é um bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo, não formador de endósporos, sendo a maioria móvel por meio de flagelos peritríquios (Forsythe, 2013).

Os sorovares ou sorotipos são classificados por meio da sorotipificação que se baseia no esquema de White-Kaufmann-Le Minor. Essa técnica relaciona a caracterização dos antígenos somáticos (O) de parede, dos flagelares (H) e dos capsulares (Vi), para definir um sorotipo (Guibourdenche et al., 2010).

Animais de sangue frio e quente atuam como reservatórios de diversos sorotipos de *Salmonella* em seu trato digestório, podendo contaminar solo, vegetação, água e alimentos (Cardoso & Carvalho, 2006). Em geral, a transmissão de *Salmonella* ocorre pela ingestão de alimentos contaminados, principalmente os que possuem alto teor de umidade, de proteína e de carboidrato,

como carne bovina, suína e de aves, ovos, leite e derivados, frutos do mar e sobremesas (Buchholz et al., 2005). Esse micro-organismo também pode ser veiculado por frutas e vegetais minimamente processados devido ao controle inadequado da temperatura, da adoção de práticas de manipulação incorreta ou por contaminação cruzada (Shinohara, 2008).

A salmonelose humana é a doença de origem alimentar com maior ocorrência em nível mundial (Chai et al., 2012; Scallan et al., 2011; Wattiau et al., 2011). Essa enfermidade geralmente causa uma gastroenterite auto-limitante cujos sintomas são náuseas, vômitos, dores abdominais e de cabeça, calafrios, diarreia e febre, que se manifestam de 12 a 36 h após o consumo de alimentos ou bebidas contaminados, durando de 2 a 3 dias. Porém, infecções graves tais como bacteremia, meningite, peritonite e miocardite têm sido relatadas (Sirinavin et al., 1999; Belloso et al., 2011; Papamichalis et al., 2011; Vidal et al., 2011). A dose infectante típica da salmonelose varia de 10^6 a 10^8 UFC/g, contudo a quantidade de células necessária para causar uma infecção humana depende da virulência de cada cepa, do grau de resistência do hospedeiro, da matriz alimentar na qual as bactérias foram ingeridas e do estado fisiológico das células bacterianas (Humphrey, 2004). De acordo com Blaser & Newman (1982) surtos podem ocorrer com doses infectantes inferiores a 10 células de *Salmonella* por grama.

Uma estimativa mundial demonstra que a quantidade de gastroenterites causadas por *Salmonella* spp. é superior a 93,8 milhões de casos, o que resulta em 155.000 mortes por ano (Hendriksen et al., 2011; Tso-

lis et al., 2011). O sorovar *Salmonella* Enteritidis foi isolado pela primeira vez durante a década de 1980, em diversos países, como uma das principais causas de surtos de salmoneloses relacionados ao consumo de frango e de ovos crus ou mal cozidos (Campioni et al, 2013). Atualmente, *S. Enteritidis* continua a ser o sorotipo mais frequentemente isolado em todo o mundo, correspondendo a 43,5% de todos os isolados de origem humana (WHO, 2012).

No Brasil, o primeiro surto de *S. Enteritidis* foi relatado por Mota et al. (1983). Mesmo assim, a prevalência desse sorotipo parece não ter aumentado até a década de 1990, quando um expressivo aumento de 1% para 64,9% foi registrado no Estado de São Paulo e na região Sul (Baú et al., 2001; Fernandes et al., 2003). Dados recentes demonstram que de 2000 a 2013, foram notificados 8.746 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) e *Salmonella* spp. foi o principal patógeno envolvido, representando aproximadamente 40% do total de agentes etiológicos identificados (SVS, 2013).

O RS possui um dos mais ativos sistemas de vigilância epidemiológica de surtos alimentares no Brasil, sendo o Estado com maior notificação desses eventos em território nacional (Malheiros et al., 2007). Dados oficiais da Vigilância Sanitária do RS apontam que *Salmonella* spp. é o principal causador de surtos desde 1993 (Téo & Oliveira, 2005). Nos anos de 2000 a 2002, foram investigados 527 surtos de DTA nesse Estado, os doentes representaram 6.986 e os hospitalizados totalizaram 2.508, o principal agente etiológico identificado nesses surtos foi *Salmonella* spp. (44,76%) (Cunha, 2008). Além disso, muitos isolados desse patógeno, originários de surtos ocorridos no RS, foram

caracterizados por análises tradicionais e moleculares, as quais permitiram a identificação de uma cepa predominante, chamada de SE86 (Tondo & Ritter, 2012).

2.1.1 *Salmonella* Enteritidis SE86

Salmonella enterica sorovar Enteritidis (cepa SE86) foi isolada de salada de repolho em um surto de salmonelose ocorrido no RS, em 1999 (Geimba et al., 2004). Essa bactéria vem sendo o principal micro-organismo causador de DTA, nos últimos anos, nesse Estado (Tondo & Ritter, 2012).

No RS, de 1999 a 2006, isolados de *S. Enteritidis* de vários surtos de origem alimentar demonstraram uma relação clonal, após serem submetidos a análises moleculares por PCR-ribotipificação, RAPD, PFGE e sequenciamento de DNA (Oliveira et al., 2007). Esse clone foi responsável por mais de 95% das salmoneloses ocorridas no Estado, recebendo o nome de *S. Enteritidis* SE86 (Geimba et al., 2004; Oliveira et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Tondo & Ritter, 2012).

Vários estudos vêm sendo realizados, a fim de caracterizar essa cepa, e os principais resultados foram os seguintes: SE86 apresentou um aumento expressivo da resistência ao ácido nalidíxico e à ampicilina, ao longo da década de 1997 a 2006 (Geimba et al., 2005; Oliveira et al., 2009; Paula et al., 2011). Essa cepa foi capaz de formar biofilmes em aço inoxidável e em polipropileno (Tondo et al., 2010), ela também sobreviveu ao hipoclorito de sódio 200 ppm durante 15 minutos (Machado et al., 2010), expressando as proteínas

RpoS e Dps após essa exposição a referida solução desinfetante (Ritter et al., 2012).

Além disso, comparando SE86 com outras cepas de *Salmonella* foi possível observar que SE86 multiplicou-se mais rapidamente durante as primeiras 6 horas em MC, do que *S. Typhimurium* e *S. Bredeney* (Malheiros et al., 2007). Também, após a exposição a um pH sub-letal (pH 4,0), SE86 tornou-se ácido-adaptada e demonstrou ser mais ácido e termo-resistente que os outros sorovares de *Salmonella* pesquisados (Malheiros et al., 2008). SE86 ácido-adaptada apresentou maior virulência do que SE86 não-ácido-adaptada e do que *S. Typhimurium* ácido-adaptada em camundongos livres de microbiota intestinal (Perez et al., 2012). Assim, essas características podem estar relacionadas com o frequente envolvimento dessa cepa em salmonelose no RS. Também nos surtos ocorridos de 1997 a 2004 o alimento mais comumente envolvido como veículo para *Salmonella* foi a salada de batata feita com maionese caseira preparada com ovos crus (Costalunga & Tondo, 2002; Silveira & Tondo, 2006; Wagner et al., 2014).

2.2 Ovos e Maionese Caseira

Os ovos e os produtos à base de ovos crus ou mal cozidos são os mais importantes alimentos veículo de *Salmonella* Enteritidis, causadoras de infecções em humanos (Braden, 2006; Barancelli et al., 2012). O ovo pode estar contaminado na superfície externa (casca) e/ou internamente (Zhang et al., 2013). Em geral, a contaminação externa é devido às fezes da galinha durante ou após a oviposição, por outro lado a infecção interna pode ser resultante da

penetração através da casca ou da contaminação direta dos conteúdos do ovo, antes da oviposição, proveniente de infecção dos órgãos reprodutivos (Figura 1) (Gantois et al., 2009).

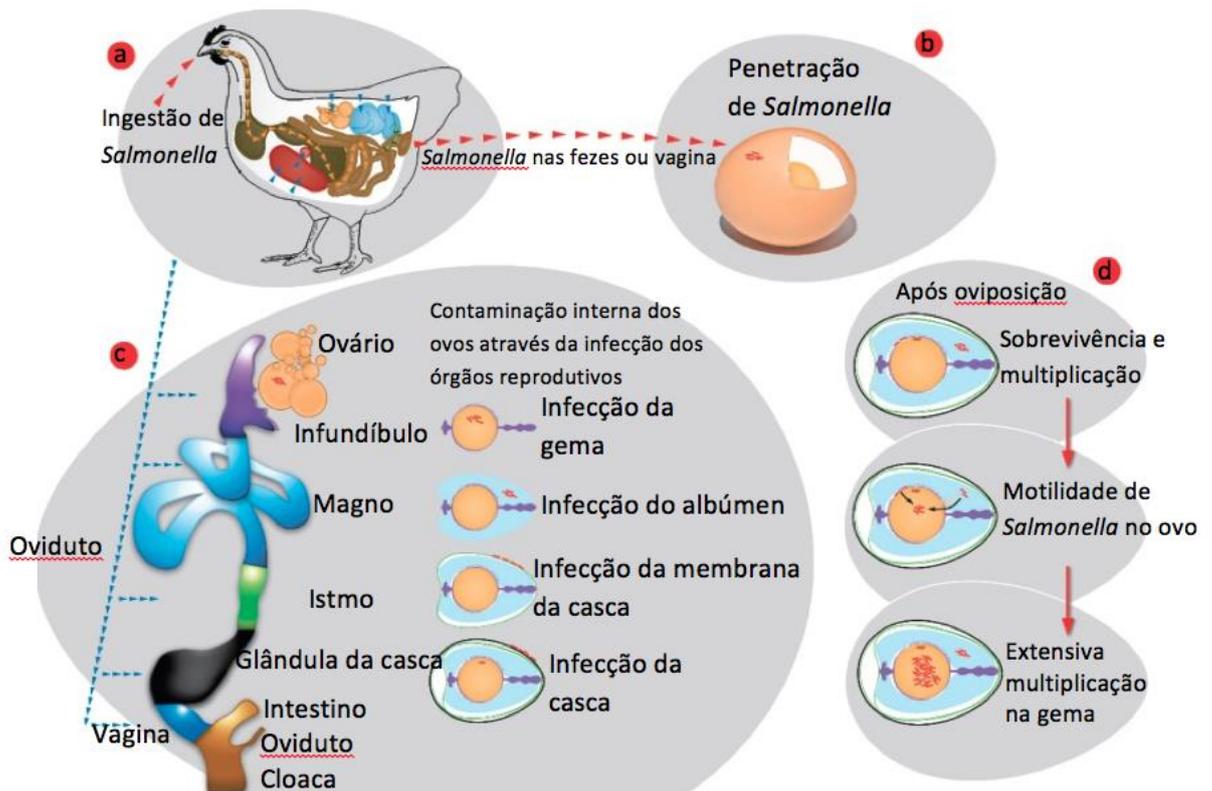


Figura 1: Patogênese da contaminação de ovos por *Salmonella*. Adaptado de Gantois et al. (2009). (a) *Salmonella* é ingerida pela galinha e entra no trato digestório. Essa bactéria começa a colonizar o intestino, sendo capaz de invadir as células epiteliais intestinais. Como consequência, macrófagos são atraídos para o local da invasão e internalizam *Salmonella*. Isso permite que essa bactéria sobreviva e multiplique-se dentro do macrófago, favorecendo a sua motilidade, visto que os macrófagos infectados migram para os órgãos internos, tais como os órgãos reprodutivos. Além dessa disseminação sistêmica, *Salmonella* também pode colonizar o oviduto por meio de infecção ascendente da cloaca. (b) Contaminação dos ovos pela penetração de *Salmonella* através da casca e das membranas da casca após a contaminação do exterior da casca. Essa contaminação da superfície da casca pode ser o resultado de uma infecção da vagina ou contaminação fecal. (c) Contaminação direta da gema, do albúmen, das membranas da casca e da casca proveniente da infecção do oviduto. (d) Após oviposição, *Salmonella* presente no albúmen é capaz de sobreviver e se multiplicar. Essa bactéria também possui a capacidade de migrar e penetrar na gema, alcançando esse ambiente rico, pode se multiplicar expressivamente.

A prevalência de *Salmonella* Enteritidis em ovos *in natura* é de 0,8% na Europa (EFSA, 2010) e de um ovo a cada 20.000 nos Estados Unidos da América (Ebel & Schlosser, 2000). Já no Brasil, observou-se uma grande diferença nos níveis de prevalência desse patógeno relatados por diversos trabalhos, variando desde a ausência até prevalência de 33% em ovos (Tabela 1). Além disso, não foi encontrado nenhum estudo brasileiro que tenha pesquisado a quantidade de *Salmonella* em ovos, experimentalmente. Téó & Oliviera, (2005), sugerem que o número de células de *S. Enteritidis* seja de aproximadamente 10 por ovo contaminado no Brasil. De acordo com Humphrey et al. (1991) 72% dos ovos naturalmente contaminados com *S. Enteritidis* tinham menos que 20 células por ovo em seu conteúdo interno no Reino Unido.

Tabela 1: Prevalência de *Salmonella* em ovos no Brasil. Apresenta o estudo (referência), o valor da prevalência encontrado e o local que foi realizado.

Referência	Prevalência de <i>Salmonella</i> no ovo	Local
Oliveira & Silva, 2000	9,6% na casca e 3,2% na gema	Campinas
Baú et al., 2001	Ausência em 94 ovos	Pelotas
Flôres et al., 2003	4,98%	Santa Maria
Andrade et al., 2004	4,46%	Goiânia
Téó & Oliviera, 2005	Menos de 1,00%	Brasil
Carvalho et al., 2006	Ausência em 96 ovos	Rio de Janeiro
Dantas et al., 2006	15,55%	Salvador
Salles, 2007	Ausência em 720 ovos	Fortaleza
DDTHA, 2008	1,6%	Brasil
Galdino, 2010	Ausência em 800 ovos	São Paulo
Oliveira & Taham, 2011	33%	Distrito Federal
Kottwitz et al., 2013	20%	Paraná

A maionese, frequentemente preparada com ovos crus, é amplamente consumida e, provavelmente, o molho mais usado em todo o mundo

(Guerra & Miguel, 2010). Ainda que a maionese possa exercer ação inibidora ao desenvolvimento de micro-organismos, na maioria das vezes, ela propicia elevada multiplicação microbiana. O ovo, principalmente a gema, apresenta características de um meio de cultura enriquecido, devido às suas propriedades nutritivas. Logo, microrganismos contaminantes podem se multiplicar rapidamente, caso a temperatura ou o pH dessa preparação não sejam controlados. Também a microbiota presente nos vegetais (como, por exemplo, a batata) e nos ovos, a falta de higiene dos manipuladores durante o seu preparo e seu manuseio, bem como as condições de armazenamento do produto, permitem que os micro-organismos possam ocasionar deteriorações no alimento ou DTA nos consumidores (Seixas, 2008). Dessa forma, esses motivos podem contribuir para a MC estar frequentemente envolvida com surtos de origem alimentar em todo o mundo (Stein-Zamir et al., 2009; Di Pinto et al., 2010; Fica et al., 2012; Norton et al., 2012).

Além disso, produtos a base de ovos, como, por exemplo, a MC, têm sido identificados como a principal preparação de alimento envolvida com salmonelose no Brasil (SVS, 2013). No RS, a MC foi identificada como o principal veículo envolvido com salmoneloses (Costalunga & Tondo, 2002; Wagner et al., 2014; Tondo & Bartz, 2014; Capalunga et al., 2014). Nesse Estado, a MC, comumente, é preparada com ovos crus e cozidos e misturada à batata cozida, sendo esse o principal acompanhamento do churrasco, refeição típica do povo gaúcho e altamente consumido nessa região do Brasil (Albrecht, 2010).

Apesar dessa problemática da contaminação da MC por SE86, ser bastante recorrente no RS, as características fisiológicas que permitiram a essa cepa tornar-se o principal patógeno alimentar desse Estado ainda não estão completamente esclarecidas. Por isso, o estudo da cinética de multiplicação desse micro-organismo pode auxiliar na compreensão do comportamento de SE86 na MC.

2.3 Multiplicação Microbiana

A multiplicação microbiana é caracterizada pelo aumento do número de células de um determinado micro-organismo. Quando essa cultura desenvolve-se em um sistema fechado, isso permite a construção de uma curva de multiplicação típica. Essa curva é dividida em quatro fases: *lag*, exponencial (*log*), estacionária e de declínio ou morte, como apresentado na Figura 2 (Ross & McMeekin, 2003).

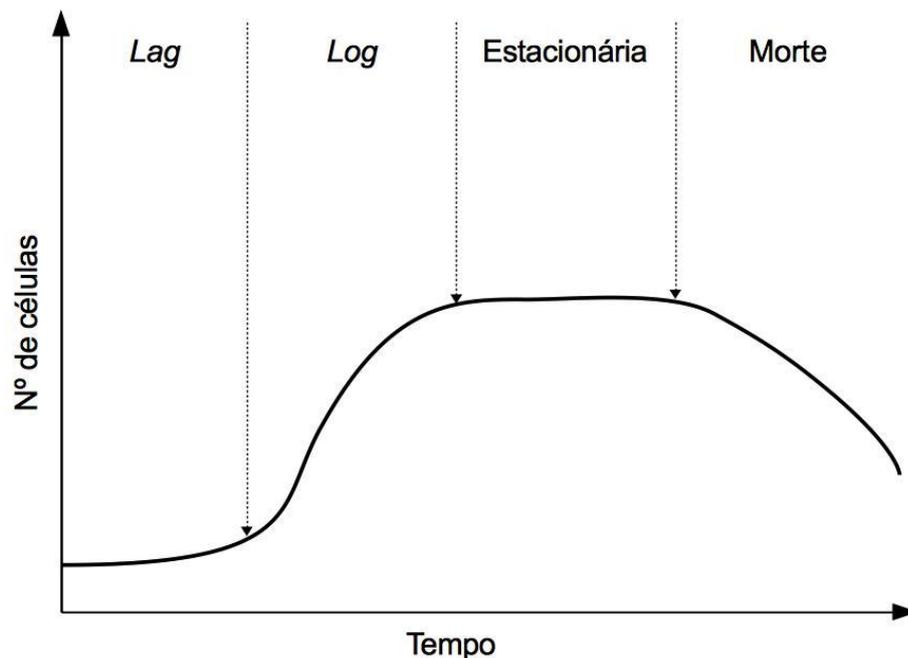


Figura 2: Curva de multiplicação microbiana dividida em suas quatro fases (Lag, Log, estacionária e morte).

A fase *lag* é um período de adaptação, no qual ocorre a síntese de várias enzimas e/ou outros constituintes celulares necessários à absorção dos nutrientes presentes no meio. Nessa fase ainda não há um aumento significativo da população, uma vez que as células estão se ajustando a esse meio. Na fase *log* os micro-organismos apresentam multiplicação exponencial, visto que as células estão adaptadas, consumindo os nutrientes, sintetizando seus constituintes e se duplicando rapidamente. É nessa fase que a população microbiana aumenta expressivamente em pouco tempo, possibilitando atingir doses infectantes ou degradar alimentos. Na fase estacionária o número de células que se dividem é equivalente ao número de células que morrem, visto que a quantidade de nutrientes está diminuindo, enquanto os produtos tóxicos estão tornando-se mais abundantes. Assim, o número de células permanece praticamente inalterado, ao longo do tempo. Também nessa fase são sintetizados vários metabólitos secundários, como, por exemplo, antibióticos e enzimas de interesse biotecnológico. Por fim, na fase de declínio a maioria das células está em processo de morte, embora outras ainda estejam se dividindo. Nessa fase, o número de células diminui expressivamente, uma vez que o ambiente tornou-se inadequado para a população microbiana. Ainda que haja um grande número de células mortas nessa fase, em condições naturais, dificilmente, todos os indivíduos da população serão inativados. Aqueles que permanecem viáveis são considerados os mais resistentes e, se tiverem condições, voltarão a se multiplicar (Martinko et al., 2010).

Além disso, a multiplicação microbiana em alimentos é dependente de vários fatores tanto intrínsecos quanto extrínsecos. Os fatores inerentes do

alimento (intrínsecos) são: pH, atividade de água (a_w), potencial de oxidação-redução, conteúdo de nutrientes, constituintes antimicrobianos, estruturas biológicas e microbiota do alimento. Já os fatores ambientais (extrínsecos) são temperatura, umidade relativa e presença e composição dos gases (Téo & Oliveira, 2005).

Os principais fatores que afetam a multiplicação de *Salmonella* spp são: a temperatura que varia de 2°C (mínima), 37°C (ótima) até 49,5°C (máxima), entretanto abaixo de 7°C a maioria dos sorotipos não se multiplica, sendo destruída em temperaturas acima de 55°C (D'Aoust, 1991; Cardoso & Carvalho, 2006). O pH para multiplicação deve ser entre 3,7 (mínimo), 6,0 a 7,5 (ótimo) e 9,6 (máximo). Outro fator determinante é a atividade de água, sendo que o valor mínimo para a multiplicação é de 0,94, porém esse patógeno é capaz de sobreviver por mais de um ano em alimentos de baixa atividade de água (Forsythe, 2013).

A cinética da multiplicação microbiana caracteriza o desenvolvimento dos micro-organismos por meio de vários parâmetros como o número inicial de células, tempo de fase *lag*, número máximo de células e taxa de multiplicação específica tanto em alimentos como em meio de cultura (Malheiros et al., 2007). O estudo desse tema possibilita a determinação de características específicas de um micro-organismo, propiciando o entendimento do comportamento dele perante diferentes substratos e temperaturas. Além disso, os parâmetros cinéticos podem ser utilizados para construção de modelos matemáti-

cos que sejam capazes de prever a multiplicação microbiana em condições não testadas experimentalmente.

2.4 Microbiologia Preditiva

A microbiologia preditiva prevê a evolução quantitativa da população microbiana ao longo do tempo, utilizando modelos matemáticos para descrever a cinética dessa multiplicação ou morte microbiana. Esses modelos podem ser classificados em: modelos de sobrevivência ou de multiplicação, dependendo da ocorrência de mortalidade ou de duplicação celular. Também é possível distingui-los entre modelos empíricos, que descrevem matematicamente um comportamento específico ou teórico que buscam mecanismos ocultos em fenômenos já observados. Um exemplo de modelo empírico é o de Ratkowsky et al. (1982), que determina uma relação linear entre a raiz quadrada da média da taxa de multiplicação de um micro-organismo e a temperatura. Enquanto que um modelo mais teórico como é o de Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994), se concentra em entender as causas da fase *lag* e introduz novos conceitos, como o estado fisiológico das células (Ferrer et al., 2009).

Além disso, os modelos podem ser divididos em primários, secundários e terciários. O modelo primário representa a dinâmica da população microbiana ao longo do tempo sob determinadas condições ambientais e de cultivo, utilizando os seguintes parâmetros: número inicial de células, taxa de multiplicação, tempo de fase *lag* e densidade populacional máxima (McKellar & Lu, 2004). Dentre os modelos primários mais utilizados (Gompertz e Baranyi), opta-se pelo modelo de Baranyi, pelo fato do modelo de Gompertz poder superesti-

mar o tempo de fase *lag* e a população máxima, conforme observado em alguns trabalhos (Baranyi & Roberts, 1994; Zwietering et al., 1990).

Já o modelo secundário descreve a resposta dos parâmetros do modelo primário às mudanças no meio ambiente, predizendo o comportamento do sistema modelado (Gumudavelli et al., 2007). Ele pode descrever, por exemplo, a taxa de multiplicação em função da temperatura ou do pH. Visto que, a temperatura é o principal fator que afeta a multiplicação microbiana e que ela pode mudar drasticamente durante o processamento e o armazenamento, 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 & Buchanan, 1993).

Por fim, o modelo terciário utiliza um ou mais modelos secundários e primários para gerar um *software* de fácil utilização, que pode ser utilizado de forma sistemática por não-modeladores (Baranyi & Tamplin, 2004). São exemplos desse modelo os seguintes programas: *Pathogen Modeling Program*, *ComBase Predictive Models*, *Food MicroModel* e *Seafood Spoilage Predictor*, sendo que os dois primeiros são de livre acesso, enquanto os dois últimos são comerciais (Ross & McMeekin, 2003).

Há diversos modos de avaliar a qualidade dos modelos gerados pelos pesquisadores. Podem ser utilizados, por exemplo, o cálculo do coeficiente de determinação (R^2), o qual é uma medida geral da predição calculada pelo modelo desenvolvido e o erro quadrático médio (RMSE) utilizado para oferecer uma medida padrão da adequação de um modelo com os dados utilizados para

produzi-lo (Wang et al., 2013). Os programas de computador (modelos terciários) podem simular situações similares às estudadas por uma determinada pesquisa, dessa forma suas simulações podem ser utilizadas para comparação dos resultados entre esses estudos (Sant'Ana et al., 2012).

Atualmente, trabalhos envolvendo a modelagem da multiplicação e da sobrevivência de diversos micro-organismos em diferentes alimentos vêm sendo desenvolvidos (Zwietering & Besten, 2011). Esses estudos têm envolvido micro-organismos patogênicos, decompositores e fermentadores, sendo que a produção de toxinas microbianas também tem sido abordada (McKellar & Delaquis, 2011; Wang et al., 2013). Em relação aos alimentos estudados há trabalhos relacionados tanto a produtos de origem vegetal, quanto animal (Sant'Ana et al., 2012; DaSilva et al., 2012).

A microbiologia preditiva é também uma ferramenta importante para a avaliação dos riscos microbianos quantitativos, pois permite entender o comportamento dos micro-organismos em função de vários fatores na cadeia alimentar (McMeekin et al., 2008). Além disso, a avaliação de risco é um dos componentes da análise de risco que é um método sistemático e altamente estruturado que se baseia em avaliações científicas, opiniões de especialistas e da comunidade em geral para possibilitar a tomada de decisões de modo consciente e adequado, sendo os principais objetivos a redução nos níveis de DTA e o melhoramento dos sistemas de segurança de alimentos (FAO/WHO, 2006).

A fim de que esses modelos matemáticos sejam utilizados na avaliação de risco é necessário aliá-los a estudos de hábitos alimentares. Dessa forma, obtêm-se resultados mais robustos e realistas.

2.5 Estudos de Hábitos Alimentares

Mudanças nos hábitos alimentares têm sido observadas nas últimas décadas, em todo o mundo, revelando a complexidade dos modelos de consumo e de seus fatores determinantes. No Brasil, a maioria dos trabalhos tem focado a produção ou o abastecimento, sendo que há poucos dados disponíveis sobre o consumo alimentar (Leal & Sturion, 2011).

Assim, é muito importante a realização de pesquisas no Brasil tendo o consumidor como objeto central da cadeia agroalimentar, abordando questões sobre o consumo, os gostos e as práticas envolvendo alimentos. Dessa forma, haveria uma melhor compreensão dos fatores implicados, e, em seguida, definição de estratégias e de mecanismos de ação nessa área fundamental que envolve a alimentação e a saúde pública (Oliveira & Thébaud-Mony, 1997).

A fim de melhor compreender as práticas que envolvem o preparo, a estocagem e o consumo da MC podem ser realizados estudos de hábitos alimentares. Esses trabalhos permitem uma melhor compreensão da realidade, possibilitando a análise do perfil dos consumidores em relação às Boas Práticas o que auxilia na sugestão de medidas de controle adequadas.

2.5.1 Boas Práticas

São procedimentos que devem ser adotados por serviços de alimentação, a fim de garantir a qualidade higiênico-sanitária e a conformidade dos

alimentos com a legislação sanitária. Eles devem ser obedecidos pelos manipuladores de alimentos desde escolha e compra dos produtos a serem utilizados no preparo do alimento até sua venda ao consumidor (ANVISA, 2008).

O objetivo das Boas Práticas é evitar a ocorrência de DTA. No Brasil, a Resolução-RDC nº 216 de 2004 (Brasil, 2004) estabelece os procedimentos de Boas Práticas para serviços de alimentação a fim de garantir essas condições higiênico-sanitárias ao alimento preparado. O RS complementa essa legislação por meio da Portaria 78 de 2009 (Rio Grande do Sul, 2009). Os principais assuntos abordados por essas legislações são como preparar um alimento com higiene para evitar a multiplicação dos micro-organismos, manter o ambiente de trabalho limpo e organizado e cuidados referentes aos manipuladores, à água e ao lixo.

As Boas Práticas para consumidores abrangem a escolha, o transporte, o preparo, a conservação e o consumo de alimentos de forma segura tanto nos domicílios quanto em serviços de alimentação. Destacam-se como principais medidas de controle: temperatura adequada de cozimento, estocagem adequada (tempo e temperatura), cuidados de higiene pessoal e da cozinha (Tondo & Bartz, 2014).

Por fim, destaca-se a importância da realização de um trabalho que alie a compreensão do comportamento cinético de um patógeno por meio de modelos matemáticos com estudos de hábitos alimentares que envolvam os principais alimentos relacionados a esse micro-organismo, visto que ambas ferramentas se complementam. Assim, podem gerar resultados mais fidedignos

capazes de subsidiar medidas de controle adequadas, bastante necessárias no caso da contaminação da MC por SE86.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo

A cepa *Salmonella* Enteritidis SE86 da Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS), Porto Alegre, Brasil foi isolada de salada de repolho associada a um surto de salmonelose que ocorreu no RS, em 1999. Essa cepa liofilizada estava armazenada, a - 20°C, antes dos experimentos. A fim de reativá-la adicionou-se 5 mL de caldo infusão de cérebro e de coração (BHI, Merck, Darsmtadt, Alemanha) e incubou-se a 37°C, por 24 h. Então, realizou-se o esgotamento em ágar padrão de contagem (PCA, Merck, Darsmtadt, Alemanha) e em ágar Lisina Xilose Desoxicolato (XLD, Merck, Darsmtadt, Alemanha), seguido de incubação a 37°C, por 18 a 24 h. Após, algumas colônias isoladas foram selecionadas para confirmação de gênero, utilizando soro polivalente para *Salmonella enterica*. Por fim, o estoque dessa cultura microbiana foi realizado em tubo Eppendorf® contendo caldo BHI e glicerol (AppliChem, Alemanha) (20%, v/v) mantido na temperatura de - 20°C até sua utilização.

3.2 Ingredientes e Preparo da Maionese Caseira

Os ingredientes para o preparo da MC foram adquiridos em um supermercado na cidade de Porto Alegre, Brasil. Apenas ovos sem rachaduras e sem contaminação visível foram utilizados. Antes do uso, os ovos foram imersos em solução de etanol a 70% (v/v), durante 30 min, a fim de permitir a descontaminação da superfície. Em seguida, os ovos foram quebrados assepticamente e as gemas foram colocadas em um béquer de vidro estéril. Uma alíquota de 25 g de gema foi testada para a presença de *Salmonella* spp., conforme ISO 6579 (ISO 6579, 2002), com o intuito de assegurar a ausência desse micro-organismo no alimento.

Os ovos inteiros foram fervidos por 10 min, até que as gemas se tornassem totalmente cozidas e sólidas e as batatas-inglesas foram descascadas, picadas e cozidas. Depois disso, as batatas e os ovos foram imediatamente resfriados a 7°C em potes estéreis fechados.

O preparo da MC foi realizado conforme metodologia adaptada de Malheiros et al. (2007). Resumidamente, a maionese foi preparada utilizando-se 20 g de gemas cruas e 20 g de gemas cozidas, 60 mL de óleo de soja puro e 200 g de batatas cozidas. Primeiramente, as gemas dos ovos foram homogeneizadas com óleo, sob agitação contínua e manual até formar uma emulsão. Em seguida, as batatas cozidas foram adicionadas e misturadas à maionese. Todos os procedimentos citados foram realizados em uma câmara de fluxo laminar. O pH final da MC foi de $6,3 \pm 0,2$; enquanto que a atividade de água (a_w) foi de $0,998 \pm 0,003$. O pH da maionese caseira pode variar de acordo

com a utilização e com a quantidade de acidificantes como o vinagre e suco de limão (esse estudo não os incluiu, pois utilizou apenas os ingredientes base da MC), enquanto que os valores de a_w são mais constantes nos diversos tipos de preparações.

A fim de testar a contaminação microbiana, 25 g de MC foram homogeneizados em 225 mL de água peptona tamponada (0,1%, m/v) (Merck, Darsmtadt, Alemanha) em um saco plástico de homogeneização Stomacher[®]. Em seguida, alíquotas de 1 mL foram distribuídas no 3M[™] Petrifilm[™] *aerobic count plate* e no 3M[™] Petrifilm[™] *Enterobacteriaceae count plate*, seguido de incubação a 37°C, durante 24 h. Esse procedimento foi realizado em triplicata e a expressão dos resultados foi realizada como indicado pelo fabricante.

3.3 Inoculação de SE86 na Maionese Caseira

A suspensão de células de SE86 foi preparada como descrito por Sant'Ana et al. (2012) com modificações. Brevemente, SE86 foi recuperada em caldo BHI por duas vezes consecutivas, incubando-se a 37°C, por 18 a 24 h. Uma alçada foi inoculada em uma alíquota de 5 mL de caldo BHI a 37°C, por 24 h. Após a cultura foi centrifugada a 4°C, por 10 min, a 2810 g, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com água peptonada (0,1%, m/v). Esse procedimento foi repetido três vezes, sendo que na terceira repetição, as células foram ressuspendidas em água peptonada (0,1%, m/v) e a concentração final de células foi ajustada por meio de densidade óptica (DO_{630nm}) e por contagem em placas a 10^8 UFC/mL. Por fim, foram preparadas diluições decimais seriadas em água peptonada (0,1%, m/v) e SE86 foi inoculada na MC,

atingindo uma concentração final de aproximadamente 20 UFC/g (1,0 a 1,6 log UFC/g). Essa concentração de inóculo foi escolhida para simular um cenário de contaminação baixa. Todos os meios de cultura utilizados foram da Merck (Darsmtadt, Alemanha).

3.4 Condições de Armazenamento e Enumeração de SE86 na Maionese Caseira

As porções de MC contaminadas pelo patógeno foram armazenadas a 7°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 37°C, em recipientes de vidro esterilizados e hermeticamente fechados, durante diferentes períodos de tempo, de forma a obter-se as culturas nas fases de adaptação, de multiplicação exponencial e estacionária. Essa ampla faixa de temperatura foi escolhida para abranger as situações que a MC pode ser exposta após seu preparo. A amostragem foi realizada em variados intervalos de tempo, dependendo da temperatura de armazenagem. Em cada ponto coletado, 10 g de amostra foram homogeneizados em 90 mL de água peptonada tamponada (1% m/v) (Merck, Darsmtadt, Alemanha), seguido de diluição decimal, em água peptonada (0,1%, m/v) (Merck, Darsmtadt, Alemanha). Após, alíquotas foram plaqueadas no 3M™ Petrifilm™ *aerobic count plate* e no ágar XLD (Merck, Darsmtadt, Alemanha), incubados a 37°C, por 18 a 24 h. No caso de contagem de *Salmonella*, pelo menos, três colônias típicas por ponto de coleta foram selecionadas para confirmação, usando soro polivalente para *Salmonella enterica*. O limite de contagem do método utilizado foi de 10¹ UFC/g. Todas as contagens bacterianas foram realizadas em triplicata. Os experimentos foram repetidos 3 vezes e os resultados foram expressos em log UFC/g.

3.5 Modelagem dos Parâmetros Cinéticos de Multiplicação de SE86 em Maionese Caseira

O modelo preditivo primário descrito por Baranyi e Roberts, (1994) foi utilizado nesse estudo para calcular os parâmetros cinéticos de multiplicação de SE86 na MC. As curvas de multiplicação para cada temperatura foram construídas por meio do ajuste dos dados ao *software* DMFit versão 2.1 Excel[®] disponível em (www.ifr.ac.uk/safety/DMfit). Os parâmetros taxa máxima de multiplicação, tempo de fase *lag* e densidade máxima da população foram obtidos. O modelo de Baranyi e Roberts, (1994) é representado nas Equações 1 a 3.

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

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

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

onde:

$\ln(N(t))$ = logaritmo natural da concentração celular no tempo t (h)
em UFC/g;

$\ln(N_0)$ = logaritmo natural da concentração celular inicial em UFC/g;

μ_{\max} = taxa máxima específica de multiplicação {[log (UFC/g)]/h};

$\ln(N_{max})$ = logaritmo natural da concentração celular máxima;

q_0 [-] = parâmetro que expressa o estado fisiológico das células quando

$t=t_0$;

t = tempo

λ = tempo de *lag* (h);

O modelo preditivo secundário foi construído utilizando o modelo de raiz quadrada descrito por Ratkowsky et al. (1982), para descrever μ (taxa de multiplicação) e λ (tempo de fase *lag*) em função da temperatura de armazenamento (Equação 4).

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

onde:

\sqrt{r} = raiz quadrada da taxa máxima de multiplicação ou do tempo de

lag;

b = coeficiente da regressão (inclinação da reta de regressão);

T = temperatura de armazenamento (°C);

T_0 = temperatura mínima conceitual para a multiplicação microbiano.

3.6 Avaliação do Ajuste do Modelo Preditivo da Maionese Caseira

Os cálculos do coeficiente de determinação (R^2) e do erro quadrático médio (RMSE) foram utilizados para avaliar o desempenho dos modelos cons-

truídos nesse estudo. O R^2 (Equação 5) é geralmente considerado uma medida geral da predição calculada pelo modelo desenvolvido, e quanto mais próximo de 1 é esse valor, melhor é o desempenho do modelo. Já o RMSE (Equação 6) é utilizado para oferecer uma medida padrão da adequação de um modelo com os dados utilizados para produzi-lo. Um RMSE de 0 indica o melhor ajuste possível entre os valores preditos e observados (Oh et al., 2012; Wang et al., 2013).

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{\hat{N}} (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^{\hat{N}} \hat{y}_i^2}$$

Equação 5

onde:

\hat{N} = número de pontos no conjunto de dados;

y_i = valor observado;

\hat{y}_i = valor predito.

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum (\mu - \hat{\mu})^2}{n}}$$

Equação 6

onde:

n = número de observações;

μ = valor observado;

$\hat{\mu}$ = valor predito.

Além disso, os programas *ComBase Predictor* ([<http://modelling.combase.cc/>]) e *Pathogen Modeling Program* (PMP) 7.0 foram utilizados para estimar os parâmetros cinéticos de multiplicação de SE86 na MC, a fim de realizar uma posterior comparação com os dados obtidos no presente estudo. Os modelos do ComBase e do PMP foram executados com os parâmetros semelhantes aos da MC preparada nesse trabalho.

Na Tabela 2 estão expressos os parâmetros utilizados para simular a multiplicação de *Salmonella* nos programas de computador. A temperatura mínima e máxima utilizadas para as predições dos modelos do PMP foram 10°C e 30°C, respectivamente, visto que esse programa não permite a seleção de uma temperatura menor que 10°C ou maior que 30°C, esse também foi o motivo pelo qual o nível inicial foi de 3,0 log UFC/mL.

Tabela 2: Parâmetros utilizados para simular a multiplicação de *Salmonella* no *ComBase Predictor* e no *Pathogen Modeling Program* (PMP). Parâmetros utilizados: pH, atividade de água, nível inicial de *Salmonella*, modelo de multiplicação e temperatura.

Parâmetro	<i>ComBase Predictor</i>	PMP 7.0
pH	6,33	6,33
a_w	0,998	0,997
Nível Inicial de <i>Salmonella</i>	1 log UFC/mL	3 log UFC/mL
Modelo de Multiplicação	" <i>salmonellae</i> com nitrito (ppm)" (nitrito (ppm) = 0)	"multiplicação aeróbia de <i>Salmonella</i> spp. em meio de cultura".
Temperaturas Simuladas	(7, 10, 15, 20, 25, 30 e 37)°C	(10, 15, 20, 25 e 30)°C

3.7 Questionário

O questionário, cuja versão completa está disponível no Apêndice 1 na página 81, foi aplicado nas 7 regiões do Estado do RS (Centro Ocidental Rio-Grandense, Centro Oriental Rio-Grandense, Metropolitana de Porto Alegre, Nordeste Rio-Grandense, Noroeste Rio-Grandense, Sudeste Rio-Grandense e Sudoeste Rio-Grandense). O número total de indivíduos participantes da pesquisa foi de 493, respeitando-se a proporção populacional de cada região do Estado. A pesquisa foi realizada no período de 23 de abril de 2013 a 23 de dezembro de 2013.

O RS está localizado no extremo sul do Brasil, apresentando uma população de 10.693.929 habitantes, sendo que 85,1% dos gaúchos se localizam nos centros urbanos. É o 5º Estado mais populoso do país com aproximadamente 6% do total da população brasileira, e uma área de 281.730,2 km², pouco mais de 3% do território brasileiro. O RS representa cerca de 7% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional, ocupando o 4º lugar, e com um PIB *per capita*, próximo a 27 mil reais. Além disso, ocupa a 3ª posição no Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) entre os Estados do país, com um IDH de 0,776 (Rio Grande do Sul, 2014).

O questionário abordou quatro temas: 1) características sócio-econômicas e demográficas dos manipuladores ou consumidores da MC; 2) práticas de preparação; 3) práticas de armazenamento e; 4) práticas de consumo de MC adotadas por manipuladores ou consumidores residentes no RS.

Essas informações foram coletadas por meio de questões fechadas. As entrevistas foram realizadas via *internet*, utilizando o programa Google Docs. O questionário foi enviado por *e-mail* para os contatos profissionais do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos - ICTA/UFRGS (aproximadamente 4.000 serviços de alimentação e indústrias de alimentos do RS), para Nutricionistas e Engenheiros de Alimentos responsáveis por serviços de alimentação, para acadêmicos de Nutrição, Farmácia, Biomedicina e Engenharia de Alimentos. Para todos esses contatos, foi solicitado que houvesse a divulgação e preenchimento do questionário por demais pessoas. A divulgação do questionário também ocorreu entre as VISA municipais e estadual do RS e na FEPPS/IPB/LACEN/RS.

Questões socioeconômicas e demográficas (idade, raça, gênero, estado civil, escolaridade, regime de trabalho, tipo de habitação e renda familiar) foram utilizadas para verificar a heterogeneidade da amostra da população do RS. Já as questões sobre preparação relacionaram quais foram as quantidades dos ingredientes da MC, enfatizando o uso e o preparo dos ovos. A realização das Boas Práticas como, por exemplo, limpeza de mãos, separação de utensílios utilizados para diferentes tipos de alimentos (crus e cozidos) e fechamento adequado de recipientes quando a MC foi preparada também foi questionada (Apêndice 1, p. 81).

Quanto aos hábitos de consumo, foi solicitado que os entrevistados indicassem a frequência e a quantidade de MC consumida por refeição. A fim de se obter informações sobre as práticas de armazenamento, questionou-se o

tempo de preparo antes de servir a MC e a temperatura que ela permaneceu acondicionada até o momento do consumo. Também foi questionado sobre quanto tempo a MC foi mantida em temperatura ambiente durante a refeição. Além disso, perguntou-se sobre as sobras da MC e sua reutilização, indagando-se sobre quanto tempo a MC permaneceu sendo consumida, se a MC foi consumida de uma única vez ou em várias refeições e onde ela foi armazenada, entre cada consumo. Por fim, questionou-se qual seria o principal critério utilizado antes de se consumir um alimento armazenado (Apêndice 1, p. 81)

Foi realizado um pré-teste do questionário, com 10 profissionais da área de Microbiologia de Alimentos, convenientemente escolhidos, a fim de aperfeiçoar as perguntas. Após os ajustes, os questionários foram enviados aos participantes.

Depois do recebimento da versão final do questionário, os dados foram analisados no Microsoft Excel 2010. Não houve exclusão de respostas, pelo fato do questionário ser *on line*. Logo, ele só pôde ser completado e enviado após todas as respostas terem sido respondidas de forma adequada.

A fim de verificar quais foram as receitas de MC mais realizadas pelos entrevistados, primeiramente selecionou-se os ingredientes mais utilizados, após testou-se todas as combinações possíveis entre eles, adotando-se nessas duas etapas o valor de ponto de corte igual a $30,0 \pm 1,0$. O valor esperado desses ingredientes mais frequentes foi calculado por meio da Equação 7:

$$E\{ingrediente|Receita\} = \frac{\sum\{ingrediente|Receita\}}{\#Receita}$$

Equação 7

onde:

Receita = ocorrência do ingrediente isoladamente em uma determinada receita.

Dessa forma, a quantidade de um determinado ingrediente em uma receita foi considerada igual ao somatório das quantidades desse ingrediente em todos os registros do questionário em que a receita foi identificada, dividido pelo número total de registros em que a receita ocorreu, ou seja, todas as receitas que não continham o ingrediente isoladamente foram excluídas do cálculo. Além disso, foi medido o pH e a atividade de água das receitas mais utilizadas pelos participantes, para posterior comparação com a MC utilizada na modelagem preditiva.

A fim de analisar o nível de Boas Práticas empregado pelos entrevistados, foi calculado o Índice de Boas Práticas ponderado (IBPp), adaptado de Leal & Sturion (2011). Esse índice considerou os diferentes pesos atribuídos às alternativas de resposta às questões da Tabela 3. Dessa forma, cada resposta foi classificada em: conforme (valor 4), parcialmente conforme (valor 2) ou não conforme (valor 0) e o IBPp foi obtido por meio da Equação 8.

$$IBPp = \frac{\sum_{i=1}^N r_i}{4 \times N}$$

Equação 8:

onde:

r_i = resposta da i -ésima questão do questionário;

Resposta conforme (C) $\Rightarrow r_i = 4$;

Resposta parcialmente conforme (PC) $\Rightarrow r_i = 2$;

Resposta não conforme (NC) $\Rightarrow r_i = 0$;

N = número de questões.

Tabela 3: Nível de conformidade das respostas às questões que compõem o índice de Boas Práticas ponderado.

Aspecto	Prática	Conformidade
Limpeza das mãos antes, durante e depois de preparar alimentos	Faz	C
	Não faz	NC
	Faz apenas antes	PC
	Faz apenas durante	PC
Separação de utensílios	Faz apenas depois	NC
	Não mistura utensílios de alimentos crus e de alimentos cozidos	C
	Utiliza os mesmos utensílios independente do tipo de alimento	NC
Principal critério para consumir um alimento armazenado	Cheiro	NC
	Gosto	NC
	Aparência	NC
	Tempo de armazenamento	C
Qual é o aspecto da gema após o ovo ser cozido	Os 4 fatores juntos	NC
	Gema ainda mole ou parcialmente mole	NC
Ovo utilizado na preparação de MC	Gema completamente dura (totalmente cozida)	C
	Ovo cru inteiro	NC
	Ovo cozido inteiro	C
	Só a gema cozida	C
	Só a gema crua	NC
	Gema cozida e gema crua	NC
Não utiliza ovo	C	

(continuação da Tabela 3)

Aspecto	Prática	Conformidade
	O tempo todo fechado, retirando-se a tampa apenas para servir-se	C
Fechamento do recipiente que armazena a MC	Fechado apenas quando fica armazenado na geladeira, <i>freezer</i> ou temperatura ambiente	PC
	Não é fechado	NC
Tempo de permanência da MC em temperatura ambiente durante a refeição	Menos de 30 min	C
	30 min a 1 h	PC
	Mais de 1 h e menos de 2 h	NC
	2 h a 6 h	NC
Onde fica a MC até o momento de servi-la (Temperatura)	Geladeira	C
	<i>Freezer</i>	C
	Temperatura ambiente	NC
Por quanto tempo a MC reaproveitada é consumida	Menos de 1 dia	C
	1 dia	C
	2 dias	C
	3 dias	NC
Onde fica a maionese que é reaproveitada	<i>Freezer</i>	C
	Geladeira	C
	Temperatura ambiente	NC

C: conforme; PC: parcialmente conforme; NC: não conforme.

O termo parcialmente conforme foi empregado para condições em que o procedimento adotado pode diminuir a possibilidade de uma contaminação, porém não significa evitá-la, já que o procedimento não foi totalmente adequado. Na Tabela 4 observa-se o nível de conformidade resultante para cada valor obtido pela equação do IBPp.

Tabela 4: Classificação de acordo com o nível de conformidade do Índice de Boas Práticas ponderado (IBPp).

IBPp	Nível de conformidade
0 – 0,35	Baixo
0,35 – 0,7	Médio
0,7 – 1	Alto

A fim de verificar o nível de adequação das Boas Práticas em relação à prevenção de surtos, desenvolveu-se no presente trabalho o Índice de Prevenção de Surto ponderado (IPSp). O IPSp foi elaborado a partir da combinação de diferentes pesos atribuídos a cada questão e a cada alternativa de sua resposta. O peso de cada pergunta foi atribuído segundo o estudo de Cunha et al. (2014) que ordenaram os principais fatores que causam surtos no Brasil da seguinte forma: fator mais importante os aspectos relacionados ao tempo e à temperatura, em segundo lugar a contaminação por manipuladores, por equipamentos e por utensílios e em terceiro a água contaminada e a matéria-prima crua. Dessa forma, as questões que envolveram tempo e temperatura receberam peso 4, questões que trataram de contaminação cruzada adquiriram peso 2 e as referentes a matéria-prima peso 1 (Tabela 5). Já as respostas foram classificadas conforme o IBPp (Tabela 3). O IPSp foi obtido por meio da Equação 9.

$$IPSp = \frac{\sum_{i=1}^N r_i \times p_i}{4 \times \sum_{i=1}^N p_i}$$

Equação 9

onde:

r_i = resposta da i -ésima questão;

p_i = peso da i -ésima questão;

Questão relacionada ao tempo e à temperatura $\Rightarrow p_i = 4$;

Questão relacionada à contaminação por manipuladores, por equipamentos e por utensílios $\Rightarrow p_i = 2$;

Questão relacionada à contaminação pela matéria-prima $\Rightarrow p_i = 1$;

N = número de questões.

Tabela 5: Questões que compõem o Índice de Prevenção de Surto ponderado e seus respectivos pesos.

Questão	Peso
Fechamento do recipiente que armazena a maionese caseira	2
Limpeza das mãos antes, durante e depois de preparar alimentos	2
Separação de utensílios	2
Principal critério para consumir um alimento armazenado	4
Qual é o aspecto da gema após o ovo ser cozido	4
Ovo utilizado na preparação de MC	1
Tempo de permanência da maionese em temperatura ambiente durante a refeição	4
Onde fica a maionese até o momento de servi-la (Temperatura)	4
Por quanto tempo a maionese reaproveitada é consumida	4
Onde fica a maionese que é reaproveitada (Temperatura)	4

Os resultados obtidos pela equação do IPSp foram classificados por nível de prevenção de surto. Essa classificação seguiu a mesma divisão do nível de conformidade do IBPp (Tabela 4).

A fim de se obter um índice mais restritivo, que representasse melhor o risco de ocorrer um surto, desenvolveu-se o Índice de Prevenção de Surto harmônico ponderado (IPShp). O IPShp foi calculado utilizando-se a Equ-

ção 10, que foi baseada na média harmônica com algumas modificações. Brevemente, utilizaram-se os mesmos valores e pesos para cada resposta e questão conforme Tabelas 3 e 5, somou-se 1 a cada valor de resposta (r_i), visto que a divisão por 0 não existe, após calculada a média diminuiu-se 1 e transformou-se o valor em porcentagem dividindo por 4. Os valores resultantes do cálculo do IPShp seguiram a mesma classificação dos demais índices (Tabela 4).

$$IPShp = \left[\frac{\sum_{i=1}^N p_i}{\sum_{i=1}^N \frac{1}{(r_i + 1) \times p_i}} - 1 \right] \times \frac{1}{4}$$

Equação 10

onde:

r_i = resposta da i -ésima questão;

p_i = peso da i -ésima questão;

N = número de questões.

Além disso, foram calculados a média e desvio-padrão para descrição de características da amostra, como, por exemplo, quantidade de ingredientes utilizados na MC realizada pelos participantes. Enquanto que as análises estatísticas foram realizadas no programa IBM® SPSS® STATISTICS versão 21.0, adotando-se o nível de significância de 5%. Essa análise testou a relação entre as variáveis, dispostas em tabelas de convergência bidimensionais, por meio do teste de qui-quadrado de Pearson.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As gemas cruas usadas nesse estudo foram negativas para *Salmonella* spp. Além disso, as amostras de MC testadas para contaminação microbiana antes da inoculação do patógeno não apresentaram nenhuma multiplicação microbiana, garantindo que a MC estava livre de micro-organismos viáveis.

As curvas de multiplicação começaram com uma população inicial de 1,0 a 1,6 log UFC/g de SE86 e a população final variou entre 6 a 9 log UFC/g. De acordo com os resultados desse estudo, SE86 sobreviveu, porém não se multiplicou na MC armazenada a 7°C durante 30 dias, como mostrado na Figura 3, sendo que a contagem de SE86 variou de 1 a 2 log UFC/g nesse período. Dessa forma, essa variação não foi considerada multiplicação, visto que quando os dados foram submetidos à modelagem primária o modelo de multiplicação não se adequou aos valores observados experimentalmente.

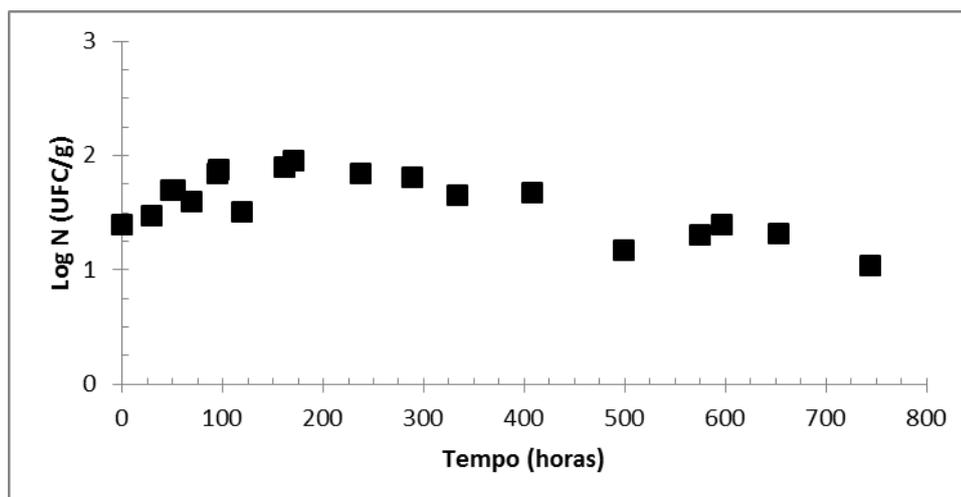


Figura 3: Comportamento de *Salmonella* Enteritidis SE86 em maionese caseira armazenada a 7°C. Cada quadrado representa a média de um ponto coletado, referente a um experimento em triplicata repetido 3 vezes. Todos os desvios-padrão foram menores que 0,45 log UFC/g.

Sabe-se que a multiplicação de *Salmonella* spp. em baixas temperaturas depende tanto da cepa, quanto do meio de cultura. Assim, a ausência de multiplicação de SE86 na MC a 7°C pode ser devido a uma combinação de fatores, incluindo a presença de inibidores microbianos (ovotransferrina, ovomucina, cistatina e avidina) nos ingredientes da MC (possíveis resquícios do albúmen) e o efeito da baixa temperatura que é um fator causador de estresse microbiano (Singh et al., 2011). Além disso, a sobrevivência, porém não a multiplicação de *S. Enteritidis* em produtos a base de ovos armazenados a 7°C também foi relatada por Gurtler & Conner (2009) e por Singh et al. (2011).

Por outro lado, algumas cepas de *Salmonella* demonstraram ser capazes de se multiplicarem a temperaturas tão baixas quanto 5,9°C em caldo complexo; 2,0°C em carnes frescas; 4,0°C em ágar e em casca de ovos (D'Aoust, 1991). De acordo com Matches & Liston (1968) a faixa de temperatura em

que *Salmonella* spp. apresenta multiplicação é de 5,3°C a 46,2°C, sendo que a multiplicação ótima é entre 35°C e 37°C. Além disso, Lanciotti et al. (2001) desenvolveram um modelo de interface multiplicação/não-multiplicação que determinou a temperatura mínima para a multiplicação de *S. Enteritidis*, cujo valor calculado foi de 4,69°C. Por fim, deve-se destacar que, embora a multiplicação de SE86 a 7°C não tenha sido observada nesse estudo, isso não significa que em todas as situações essa cepa se comportaria dessa forma. Visto que nesse trabalho, foi utilizada uma abordagem de modelagem cinética, porém dependendo de uma série de fatores, probabilidades diferentes de multiplicação para essa condição limite podem ser obtidas.

A Tabela 6 apresenta os parâmetros de multiplicação (taxa de multiplicação, tempo de fase *lag* e população final) de SE86 na MC, em diferentes temperaturas, os valores foram estimados pelo DMFit. Essa tabela também mostra os parâmetros preditos pelo *ComBase Predictive Model* e pelo *Pathogen Modeling Program 7.0*. A comparação dos resultados demonstrou que as taxas de multiplicação observadas na MC resultantes dos experimentos microbiológicos e do DMFit foram muito semelhantes às taxas de multiplicação modeladas pelo ComBase. Entretanto, o PMP apresentou taxas de multiplicação mais rápidas. Esses resultados podem ser explicados pelo fato do ComBase usar o mesmo modelo que o DMFit utiliza para calcular esses parâmetros, enquanto o PMP usa a função de Gompertz.

Já os tempos de fase *lag* – também presentes na Tabela 6 – foram menores na MC do que no PMP 7.0 e no ComBase. Esses valores menores da

fase *lag* de SE86 na MC em todas as temperaturas estudadas (variando de 1,2 h até 17,8 h) podem indicar que a MC é um bom substrato para a multiplicação de SE86, permitindo uma rápida adaptação a essa cepa, devido à quantidade de nutrientes disponíveis, por exemplo. Por outro lado, essa diferença nos tempos de fase *lag* observada entre a MC e os programas de computador pode ser devido ao ComBase e ao PMP considerarem a multiplicação de *Salmonella* spp. em meio de cultura tipo caldo, enquanto os dados obtidos nesse estudo foram gerados utilizando a multiplicação de uma cepa específica de *Salmonella* (SE86) em uma preparação de alimento específica, ou seja, MC.

Tabela 6: Parâmetros cinéticos de multiplicação de *Salmonella* em maionese caseira (MC), no *ComBase Predictive Model* e no *Pathogen Modeling Program* (PMP) 7.0, em diferentes temperaturas. A 7°C, a multiplicação de SE86 na MC não foi observada. Enquanto que as temperaturas 7°C e 37°C não estavam disponíveis para simulação no PMP.

Parâmetros de multiplicação	Modelo	Temperatura (°C)						
		7	10	15	20	25	30	37
μ_{max}	MC	-	0,028	0,103	0,225	0,441	0,668	0,988
λ		-	17,816	8,183	3,679	2,154	1,645	1,231
FP		-	6,227	8,908	9,275	9,213	9,461	9,285
μ_{max}	Com Base	0,016	0,034	0,104	0,252	0,484	0,74	0,913
λ		205,62	96,764	31,634	13,055	6,797	4,445	3,603
FP		8,52	8,52	8,52	8,52	8,52	8,52	8,52
μ_{max}	PMP	-	0,053	0,195	0,483	0,802	0,889	-
λ		-	61,5	16,8	6,8	4,1	3,7	-
FP		-	9,22	9,1	9,21	9,2	9,23	-

μ_{max} = taxa de multiplicação (log UFC/g/h); λ = tempo de fase *lag* (h); FP = população final (log UFC/g).

A população final de SE86 na MC variou de 10^6 UFC/g a 10°C até 10^9 UFC/g nas demais temperaturas (exceto a 15°C = 10^8 UFC/g). Nas Figuras

4 a 9, é possível observar quando a população final de SE86 na MC foi atingida em cada temperatura estudada. A 37°C, a população final de 10^9 UFC/g, foi observada após 13 h (Figura 4), a 30°C, a densidade máxima de células foi alcançada em 19 h (Figura 5), a 25°C em 23,5 h (Figura 6), a 20°C em 2,25 dias (Figura 7), a 15°C em 4,75 dias (Figura 8) e a 10°C após 10 dias (Figura 9).

Os parâmetros de multiplicação da SE86 na MC foram muito semelhantes aos demonstrados por Gumudavelli et al. (2007) que testaram *S. Enteritidis* multiplicando-se em gema de ovo. Assim pode-se inferir que a MC é um substrato bastante rico, sendo que as batatas e o óleo acrescidos às gemas de ovos não agiram como inibidores de multiplicação. No entanto, Singh et al. (2011) modelaram a multiplicação de *Salmonella* spp. em ovo líquido inteiro, demonstrando taxas de multiplicação menores que SE86 na MC. Essa diferença pode estar relacionada à presença de clara e suas proteínas com atividade antimicrobiana no trabalho desses autores, já no preparo da MC do presente estudo não se adicionaram as claras.

De acordo com Humphrey (2004), a dose infectante típica para *Salmonella* é de 10^6 a 10^8 UFC/g, no entanto vários surtos demonstraram que essa dose pode ser substancialmente menor como, por exemplo, 10^0 UFC/g. Assumindo a dose infectante de 10^6 UFC/g, SE86 multiplicando-se em MC poderia causar salmonelose apenas depois de 6 h a 37°C (Figura 4), o que é um cenário possível no verão do RS.

Nesse Estado, muitas vezes, grandes quantidades de MC são servidas nas festividades comunitárias, dessa forma, procede-se com a sua preparação antecipadamente. A fim de serem refrigeradas, essas grandes quantidades de MC exigem muito espaço dentro de geladeiras, o que nem sempre é possível. Assim, a MC é mantida em temperatura ambiente durante várias horas, o que permite a multiplicação de *Salmonella* devido ao tempo e à temperatura de exposição. Também, a concentração inicial de SE86 utilizada no presente estudo foi baixa, caso fosse maior, a dose infectante seria alcançada mais rapidamente, podendo explicar os surtos de salmonelose após poucas horas de abuso de temperatura.

Malheiros et al. (2007) compararam a multiplicação de SE86, *S. Bredeney* e *S. Typhimurium* em MC a 30°C, constatando que SE86 multiplicou-se mais rapidamente do que os outros sorovares, durante as primeiras 6 h. Também Mürmann et al. (2008) determinaram a quantidade de *S. Enteritidis* presente em alimentos implicados em surtos ocorridos no RS em 2005, constatando que as contagens mais elevadas ($>10^7$ NMP/g) foram detectadas em alimentos contendo maionese. Portanto, o isolamento frequente de *S. Enteritidis* de aves ou de produtos a base de ovos e a capacidade de multiplicação rápida de SE86 em MC podem explicar a grande associação desse microorganismo nos surtos envolvendo esse alimento no RS.

A 30°C (Figura 5) SE86 levou 8,3 h para alcançar 10^6 UFC/g, a 25°C (Figura 6) foram necessárias 12 h, a 20°C (Figura 7) um dia, a 15°C (Figura 8) 2,3 dias e a 10°C (Figura 9) 8,1 dias. Todas essas condições não são comu-

mente alcançadas durante a preparação, o consumo e a estocagem da MC, porque normalmente a MC permanece menos de 8 h sem refrigeração e é consumida em no máximo 3 dias após seu preparo (dados apresentados pelo questionário).

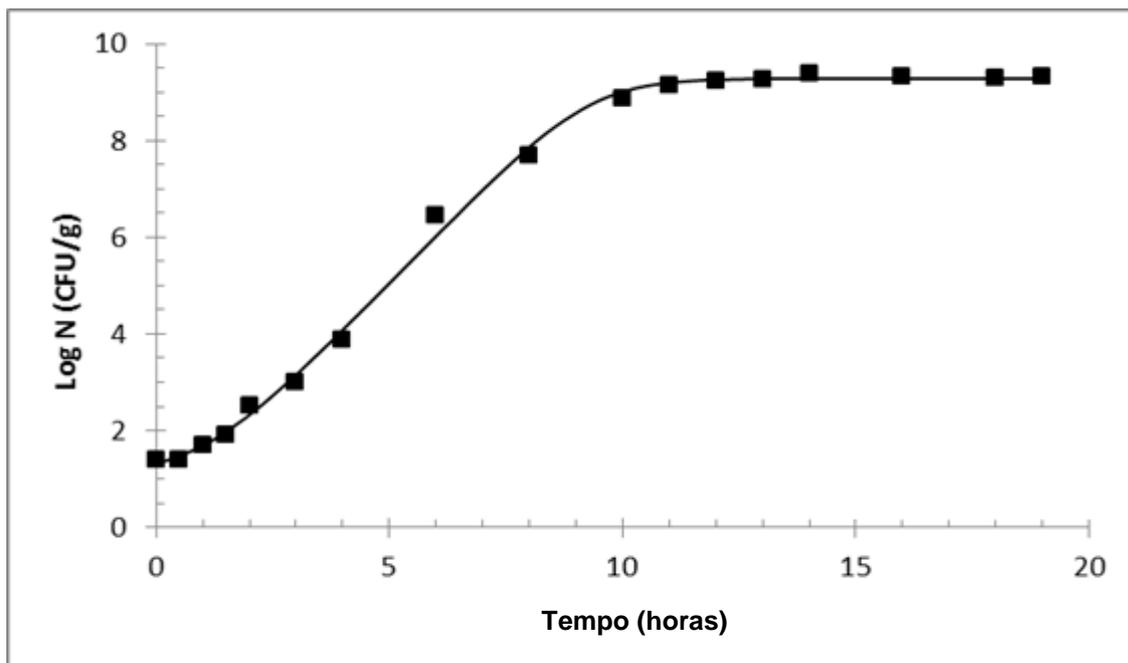


Figura 4: Multiplicação de *Salmonella Enteritidis* SE86 em maionese caseira armazenada a 37°C. O modelo primário está representado pela linha, possuindo um $R^2 = 0,99$ e os quadrados são os valores das médias experimentais.

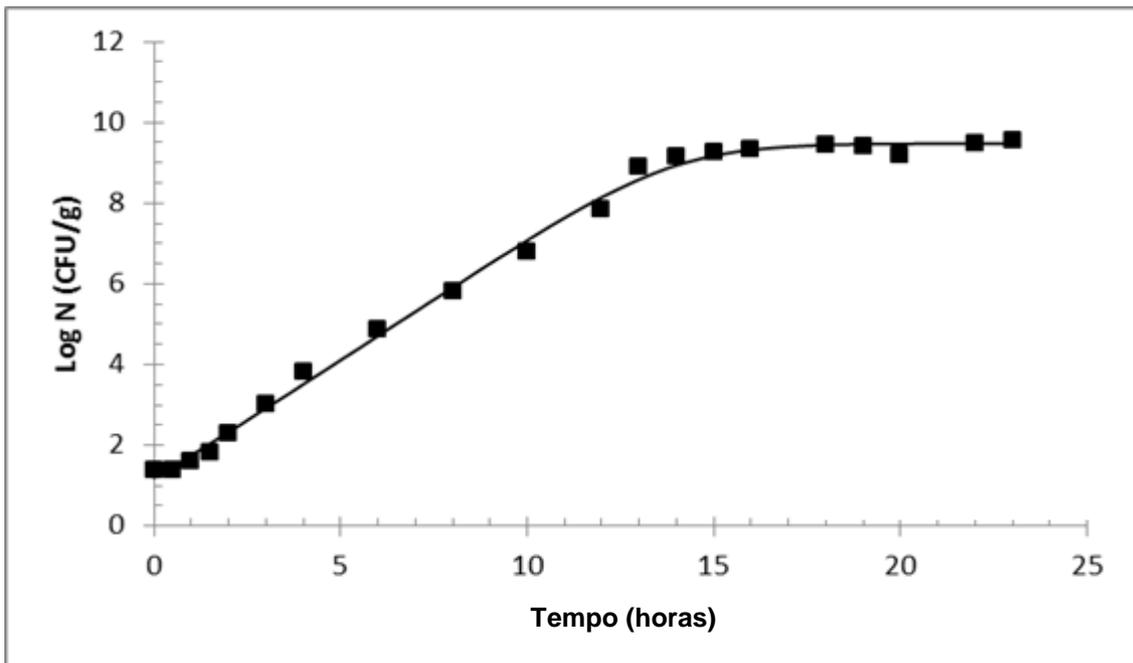


Figura 5: Multiplicação de *Salmonella Enteritidis* SE86 em maionese caseira armazenada a 30°C. O modelo primário está representado pela linha, possuindo um $R^2 = 0,99$ e os quadrados são os valores das médias experimentais.

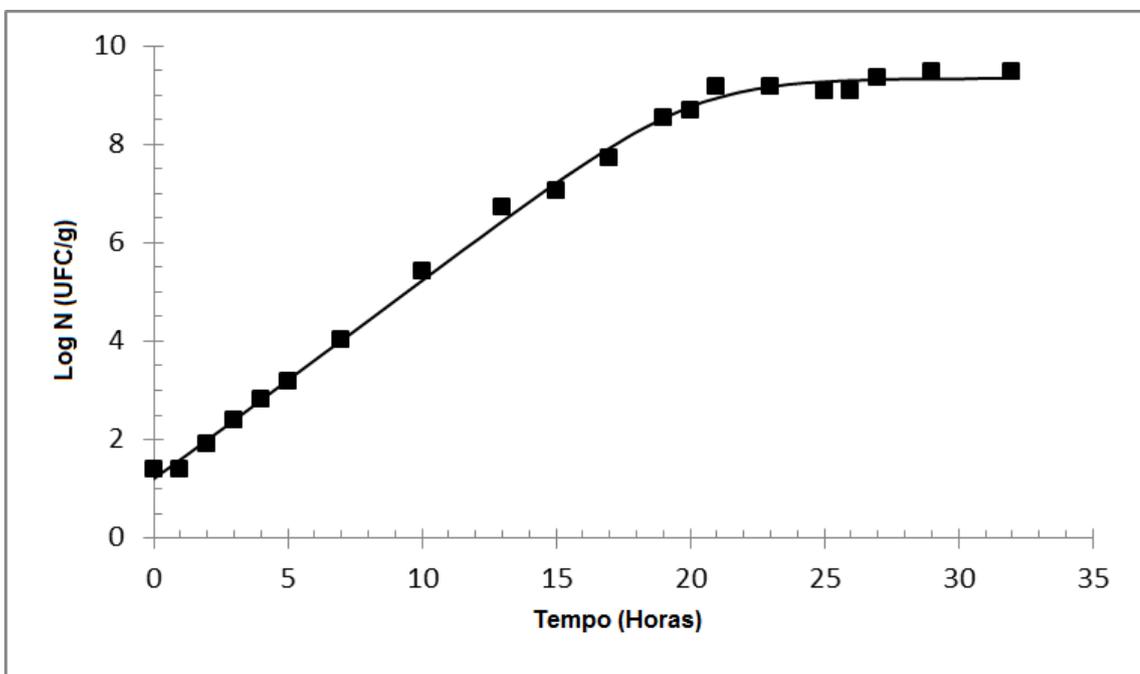


Figura 6: Multiplicação de *Salmonella Enteritidis* SE86 em maionese caseira armazenada a 25°C. O modelo primário está representado pela linha, possuindo um $R^2 = 0,99$ e os quadrados são os valores das médias experimentais.

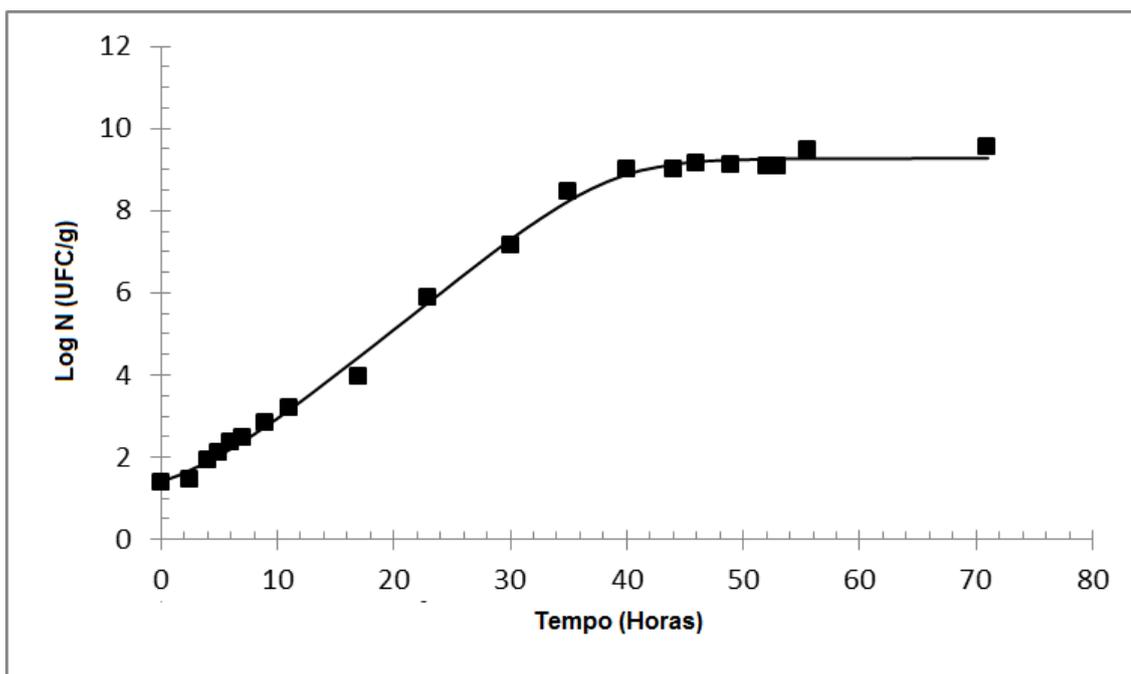


Figura 7: Multiplicação de *Salmonella Enteritidis* SE86 em maionese caseira armazenada a 20°C. O modelo primário está representado pela linha, possuindo um $R^2 = 0,99$ e os quadrados são os valores das médias experimentais.

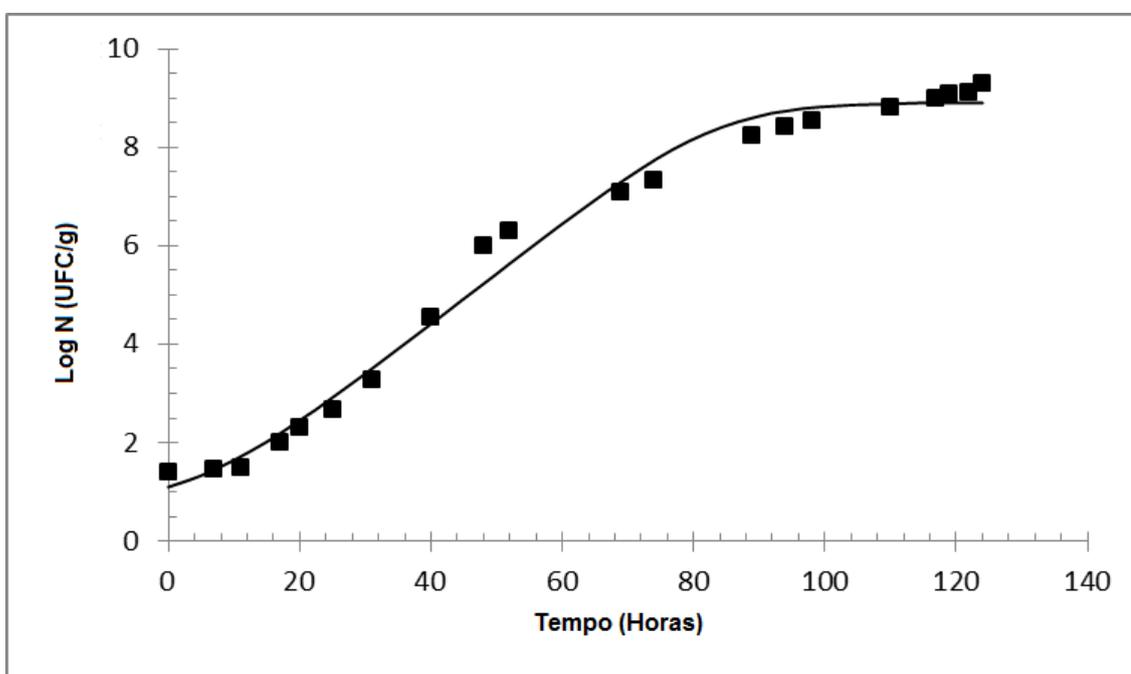


Figura 8: Multiplicação de *Salmonella Enteritidis* SE86 em maionese caseira armazenada a 15°C. O modelo primário está representado pela linha, possuindo um $R^2 = 0,98$ e os quadrados são os valores das médias experimentais.

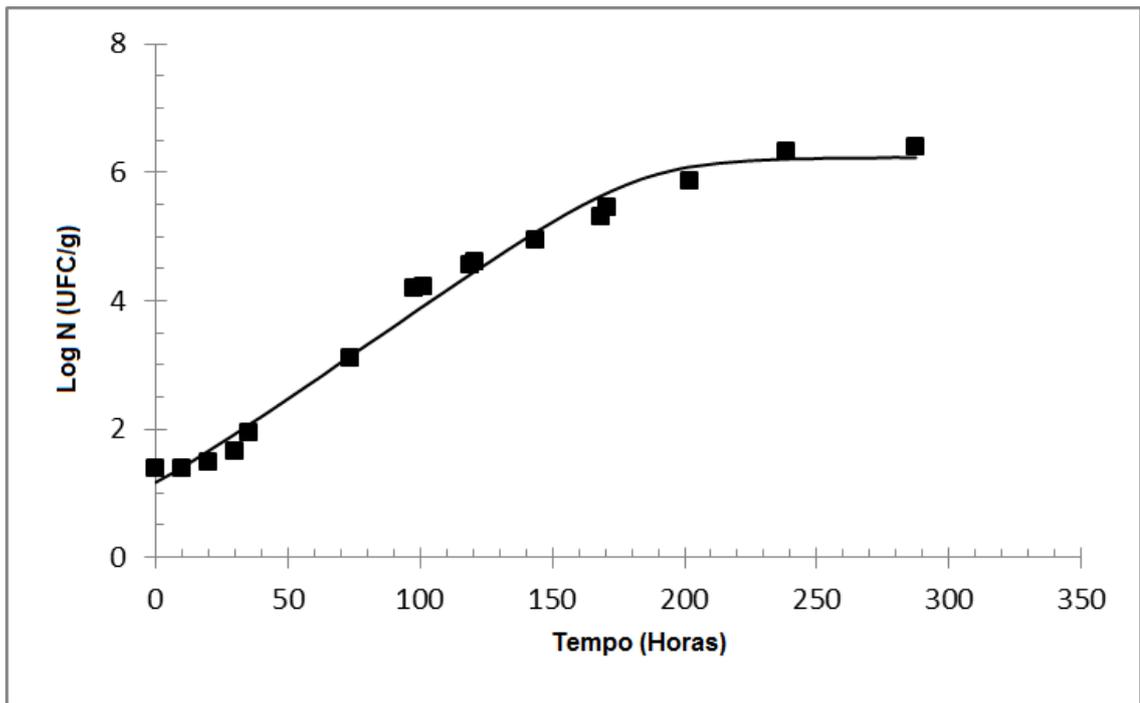


Figura 9: Multiplicação de *Salmonella Enteritidis* SE86 em maionese caseira armazenada a 10°C. O modelo primário está representado pela linha, possuindo um $R^2 = 0,98$ e os quadrados são os valores das médias experimentais.

As Figuras 4 a 10 apresentam os dados experimentais (valores observados) ajustados ao modelo de Baranyi (modelo primário). Além disso, os valores de R^2 do modelo primário foram iguais a 0,99 para 37°C, 30°C, 25°C e 20°C e 0,98 para 15°C e 10°C. Com base nesses resultados, é evidente que existe um ajuste entre os dados experimentais e os do modelo primário. Já a Figura 10 reúne as curvas de multiplicação de SE86 em MC ajustadas ao modelo primário, o que permite uma melhor comparação visual entre elas.

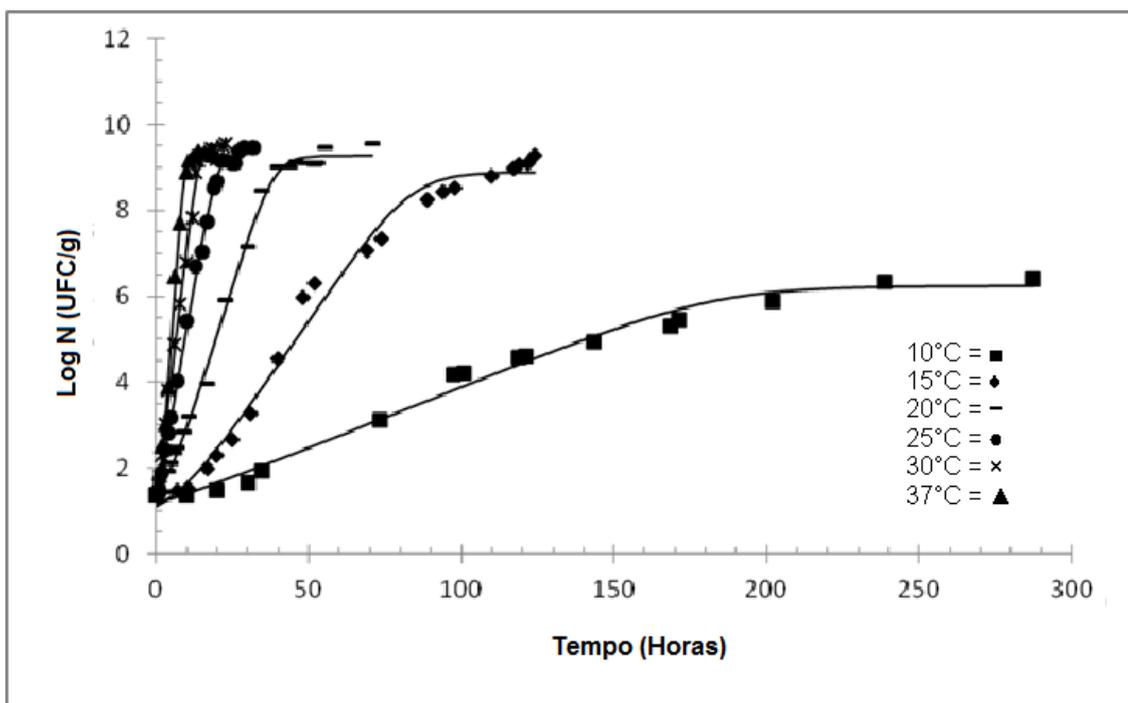


Figura 10: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 em maionese caseira armazenada a 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 37°C ajustada aos dados do DMFit versão 2.1. As linhas representam o modelo primário. Cada símbolo representa a média de resultados em triplicata e repetidos 3 vezes. Todos os desvios-padrão foram menores que 0,55 log UFC/g.

Os parâmetros obtidos no modelo primário (os valores de taxa de multiplicação máxima e tempo de fase *lag*) foram usados para elaborar o modelo secundário (Tabela 7), que permitiu a predição da taxa de multiplicação com base na variação da temperatura. A adequação do ajuste de um modelo preditivo é geralmente caracterizada pelo RMSE e pelo coeficiente de determinação (R^2), cujos valores foram, respectivamente, 0,016 e 0,9967 para o modelo da MC, ratificando sua precisão. Além disso, a Tabela 7 também apresenta os modelos secundários calculados baseados nas simulações realizadas nos programas de computador e seus respectivos valores de adequação do ajuste. Baseados nesses resultados e considerando a similaridade entre os modelos secundários pode-se afirmar que o modelo elaborado no presente estudo é

adequado para modelar a multiplicação de *Salmonella sp* em MC sob várias condições de temperatura e que também poderia ser utilizado para prever a multiplicação dessa bactéria em outros substratos com similar pH e atividade de água, como, por exemplo, ovos e outros produtos a base deles.

Tabela 7: Modelo secundário representado pela equação da raiz quadrada, que mostra a relação entre a taxa de multiplicação e a temperatura de SE86 na maionese caseira e calculada a partir dos programas de computador (ComBase e PMP), juntamente com os seus respectivos valores de R^2 e de RMSE.

	Modelo Secundário	R^2	RMSE
MC	$\sqrt{\mu} = 0.0313(T - 4.48)$	0,99	0,016
ComBase	$\sqrt{\mu} = 0.03(T - 3.17)$	0,98	0,037
PMP	$\sqrt{\mu} = 0.0376(T - 2.94)$	0,96	0,053

μ = taxa de multiplicação (log UFC/g/h); T = temperatura (°C).

Com base nos resultados da modelagem da multiplicação de SE86 em MC, pode-se afirmar que os padrões de temperatura (inferior a 5°C para alimentos refrigerados e inferior ou igual a – 18°C para congelados) exigidos pela Resolução-RDC nº 216 de 2004 (Brasil, 2004), são rígidos e não permitiriam a multiplicação dessa cepa nesse alimento, porém essa legislação é destinada aos serviços de alimentação, sendo que o manipulador domiciliar não tem obrigação de segui-la. Além disso, a maioria (40%) dos surtos de salmonelose veiculadas por MC ocorreram dentro de residências (SVS, 2013). Assim, na tentativa de compreender esses surtos domiciliares foram analisados os dados do questionário sobre preparação, armazenagem e consumo de MC.

A Tabela 8 demonstra algumas das características socioeconômicas e demográficas questionadas aos entrevistados. Percebe-se, a predominância

do gênero feminino (83%), da faixa etária de 25 a 34 anos (38%), da raça branca (89%), da renda familiar superior a 5 salários mínimos, da escolaridade ensino superior (31%) e da residência na região metropolitana de Porto Alegre na população abordada nesse estudo. Cabe ressaltar que a proporcionalidade de habitantes por região do Estado foi respeitada no presente estudo.

Tabela 8: Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com: gênero, faixa etária, raça, renda familiar, escolaridade e região do Estado que reside.

Características socioeconômicas	Frequência	
	n	%
Gênero		
Masculino	84	17
Feminino	409	83
Total	493	100
Faixa etária		
Menos de 18 anos	8	2
18 a 24 anos	116	24
25 a 34 anos	185	38
35 a 44 anos	82	17
45 a 54 anos	65	13
55 a 64 anos	26	5
65 anos ou mais	11	2
Total	493	100
Raça		
Branco	440	89
Negro	23	5
Pardo	29	6
Índio	1	0
Total	493	100
Renda familiar		
Menos de 1 salário mínimo	8	2
1 salário mínimo	13	3
2 salários mínimos	52	11
3 salários mínimos	67	14
4 salários mínimos	65	13
5 salários mínimos	66	13
Mais de 5 salários mínimos	222	45
Total	493	100

(Continuação da Tabela 8)

Escolaridade	Frequência	
	n	%
Características socioeconômicas		
Ensino fundamental ^a	96	19
Ensino médio ^a	101	21
Ensino superior ^a	152	31
Pós-graduação ^a	144	29
Total	493	100
Região do Estado em que reside		
Centro Ocidental Rio-Grandense	20	4
Centro Oriental Rio-Grandense	30	6
Metropolitana de Porto Alegre	246	50
Nordeste Rio-Grandense,	44	9
Noroeste Rio-Grandense	84	17
Sudeste Rio-Grandense	39	8
Sudoeste Rio-Grandense	30	6
Total	493	100

^a refere-se à escolaridade completa ou incompleta.

A Tabela 9 apresenta o perfil de consumo da MC. Esse hábito de consumir MC foi observado em 75% dos entrevistados. A frequência desse consumo foi de no mínimo 1 vez por semana para 26% dos indivíduos e de no mínimo 1 vez por mês para 43% das pessoas entrevistadas. A quantidade de MC consumida em cada refeição variou de menos de 1 colher de sopa a mais de 4 colheres de sopa, sendo que as quantidades mais declaradas foram 2 (37%) e 3 (30%) colheres. Além disso, a relação entre a quantidade e a frequência que cada entrevistado consumiu de MC foi similar para todos os grupos de resposta (dado não mostrado).

Fisberg et al. (2008) realizou um estudo de frequência alimentar, na cidade de São Paulo, encontrando a quantidade de 3 colheres de sopa de salada de maionese com legumes como o consumo médio da população. Enquanto que essa quantidade foi a segunda mais encontrada no presente estudo.

Tabela 9: Práticas de consumo de maionese caseira, apresentando a frequência e a quantidade consumida.

Práticas de consumo	Frequência	
	n	%
Consome maionese caseira		
Sim	371	75
Não	122	25
Total	493	100
Frequência que consome MC		
No mínimo 1 vez por dia	1	0
No mínimo 1 vez por semana	94	26
No mínimo 1 vez por mês	161	43
No mínimo 1 vez a cada 6 meses	89	24
No mínimo 1 vez por ano	26	7
Total	371	100
Quantidade que consome de MC		
Menos de 1 colher de sopa	8	2
1 colher de sopa (40g)	56	15
2 colheres de sopa (80g)	139	37
3 colheres de sopa (120g)	112	30
4 colheres de sopa (160g)	38	11
Mais de 4 colheres de sopa	18	5
Total	371	100

Na Tabela 10 estão representadas algumas das práticas de estocagem de MC. Em geral, a MC foi preparada de 30 min a 1 h (46%) antes de ser servida, sendo armazenada na geladeira antes de ser consumida em 81% dos casos e permanecendo durante a refeição de 30 min a 1 h (63%) em temperatura ambiente. Segundo a Portaria 78/2009 (Rio Grande do Sul, 2009) um produto perecível deve permanecer em temperatura ambiente por no máximo 30 min, assim apenas 21% dos entrevistados estão de acordo com esse padrão. Em relação aos participantes que deixam a MC em temperatura ambiente após seu preparo em 46% (30 participantes) dos casos esse tempo de permanência foi superior a 30 min, também estando em desacordo com a legislação e permitindo a multiplicação de *Salmonella* na MC, dependendo da temperatura e do tempo que ela permanecer nessa situação.

Além disso, em 51% das respostas o recipiente que conservou a maionese não foi tampado ou foi fechado inadequadamente. Essa atitude pode favorecer a contaminação cruzada, pois permite uma maior exposição do alimento ao ambiente externo.

Tabela 10: Práticas de estocagem da maionese caseira, em relação ao tempo, à temperatura e aos recipientes utilizados.

Práticas de estocagem	Frequência	
	n	%
Quanto tempo antes de servir é preparada a MC		
Menos de 30 min	132	35
De 30 min a 1 hora	173	46
Mais de 1 hora, mas menos de 2 horas	65	17
De 2 a 6 horas	8	2
Total	378	100
Onde fica a maionese até o momento de servi-la		
Na geladeira	307	81
No freezer	6	2
Temperatura ambiente	65	17
Total	378	100
Tempo de permanência da maionese em temperatura ambiente durante a refeição		
Menos de 30 min	79	21
De 30 min a 1 hora	240	63
Mais de 1 hora, mas menos de 2 horas	56	15
De 2 a 6 horas	3	1
Total	378	100
Fechamento do recipiente que armazena a maionese caseira		
O tempo todo fechado, retirando-se a tampa apenas para servir-se	186	49
Fechado apenas quando fica armazenado na geladeira, freezer ou temperatura ambiente	139	37
Não é fechado	53	14
Total	378	100

Na Tabela 11 apresentam-se as práticas de reaproveitamento das sobras de MC. A maioria dos entrevistados (66%) declarou reaproveitar a MC por menos de um dia (44%), de uma só vez (76%), armazenando-a na geladeira (99%) até seu consumo. Supondo-se que a temperatura dos aparelhos refri-

gerados esteja adequada a conduta da maioria dos participantes perante o reaproveitamento da MC está correta. Além disso, nenhum participante armazena as sobras de MC em temperatura ambiente. Porém cabe ressaltar que o processo de estocagem da MC já pode ter sofrido abuso de temperatura do preparo até o primeiro consumo, assim dos 46% de participantes que deixam a MC em temperatura ambiente após o preparo por mais de 30 min, 80% (24) reaproveita essa MC, na qual já pode ter ocorrido a multiplicação de *Salmonella*.

Tabela 11: Práticas de estocagem das sobras de maionese caseira, em relação ao tempo, à temperatura e ao modo de reaproveitamento.

Reaproveitamento das sobras de MC	Frequência	
	n	%
É reaproveitada		
Sim	250	66
Não	128	34
Total	378	100
Por quanto tempo a maionese reaproveitada é consumida		
Menos de 1 dia	110	44
1 dia	104	42
2 dias	30	12
3 dias	6	2
Total	250	100
É reaproveitada		
De uma só vez	190	76
Em porções	60	24
Total	250	100
Onde fica a maionese que é reaproveitada		
No freezer	3	1
Na geladeira	247	99
Total	250	100

A Tabela 12 mostra as práticas de preparo da MC. Primeiramente, 77% dos participantes declararam preparar MC, desses apenas 7% preparam

MC sem ovos. A maioria (51%) utiliza gema crua e gema cozida, assim como a receita utilizada para fazer a modelagem da multiplicação de SE86. Além disso, em 75% dos casos a receita apresenta ovo cru. A portaria 78/09 (Rio Grande do Sul, 2009) não permite a utilização de ovos crus em preparações sem cocção, além de recomendar o uso de ovos pasteurizados, desidratados ou cozidos nesse tipo de preparação. Entretanto sabe-se que os consumidores utilizam ovos *in natura* para preparações caseiras (Rodrigues & Saley, 2001), assim expõem-se ao perigo da presença de *Salmonella* no ovo. Portanto, esse expressivo uso de ovos crus nas receitas de MC juntamente com os abusos de tempo e temperatura podem ajudar a explicar o motivo de a MC ser o principal veículo para *Salmonella* no RS.

Tabela 12: Práticas de preparo da maionese caseira, enfatizando o uso de ovos e o aspecto da gema cozida.

Práticas de preparo	Frequência	
	n	%
Prepara MC		
Sim	378	77
Não	115	23
Total	493	100
Utiliza ovo na MC		
Sim, uso ovo cru inteiro (clara e gema)	66	17
Sim, uso ovo cozido inteiro	18	5
Sim, uso só a gema crua	27	7
Sim, uso só a gema cozida	47	12
Sim, uso gema crua e gema cozida	193	51
Não, uso ovo	27	7
Total	378	100
Qual é o aspecto da gema após o ovo ser cozido		
Gema ainda mole ou parcialmente mole	14	5
Gema completamente dura (totalmente cozida)	244	95
Total	258	100

Observou-se que em 95% dos casos o processo de cozimento dos ovos foi conforme a Portaria 78/09 (Rio Grande do Sul, 2009) orienta, ou seja, os ovos que forem submetidos à cocção devem apresentar toda a gema dura (Tabela 12). Também, segundo a Portaria 5/13 (São Paulo, 2013) os ovos cozidos devem ser fervidos por sete minutos, para alcançar esse resultado de gema completamente cozida. Porém, essa medida não evitará o perigo da presença de *Salmonella*, caso a receita da MC também utilizar ovo cru, que é o caso da maioria das receitas.

A Figura 11 apresenta a quantidade de entrevistados que utiliza cada ingrediente da MC. O óleo, os ovos e as batatas foram os ingredientes mais utilizados, sendo citados por mais de 350 participantes. Ressalta-se que esses foram os ingredientes escolhidos para a receita da MC que modelou a multiplicação de SE86. Além disso, o vinagre e o suco de limão foram mencionados por 199 e por 66 entrevistados, respectivamente, ocupando o quarto e o quinto lugares dos ingredientes mais usados. Esse dado é preocupante, visto que SE86 após exposição a pH sub-letal (4,0) tornou-se ácido e termo-resistente (Malheiros et al., 2008). Também, SE86 ácido- adaptada apresentou maior virulência do que SE86 não-ácido-adaptada em camundongos livres de germes (Perez et al., 2012). Dessa forma, essas características podem estar relacionadas com o frequente envolvimento dessa cepa com os surtos cujo alimento envolvido é a MC.

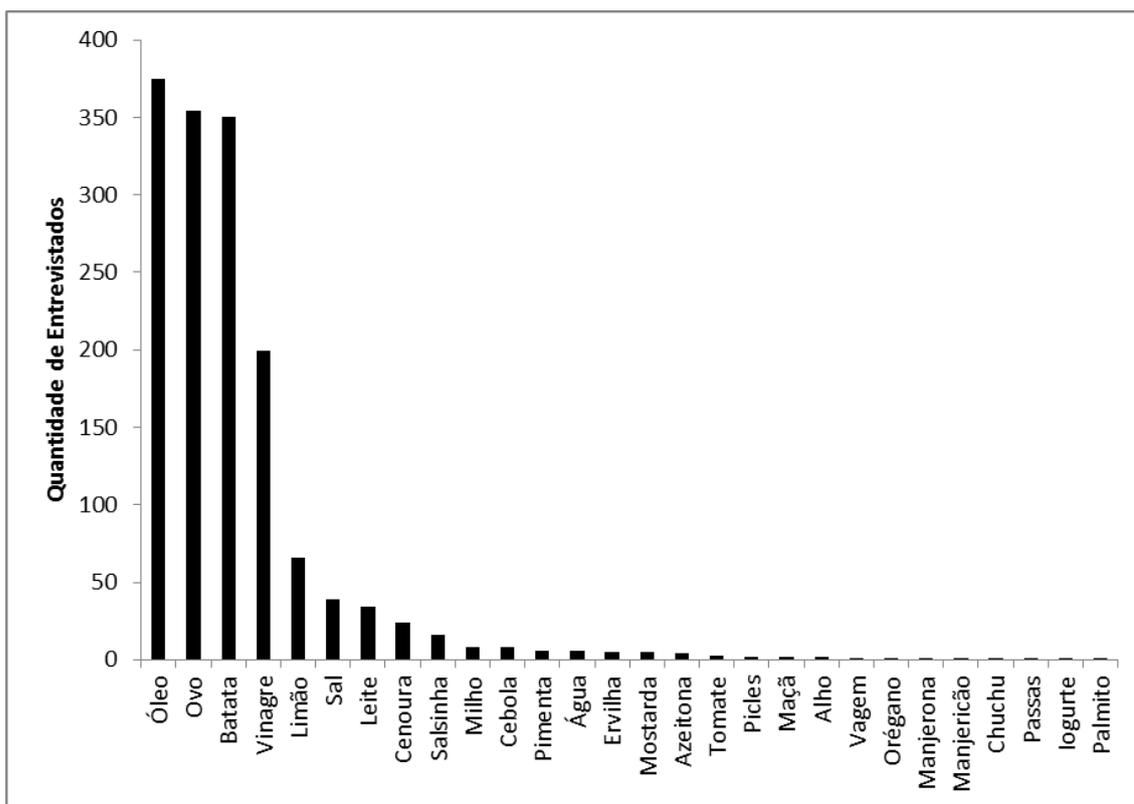


Figura 11: Quantidade de entrevistados que utilizam determinado ingrediente na preparação da maionese caseira

A Figura 12 apresenta as médias e desvios-padrão das quantidades dos ingredientes quando utilizados na MC. As maiores quantidades encontradas foram de batata, óleo e leite. Cabe ressaltar que essa média não considerou a frequência em que o ingrediente foi utilizado na MC, mas sim a quantidade usada quando ele esteve presente na preparação.

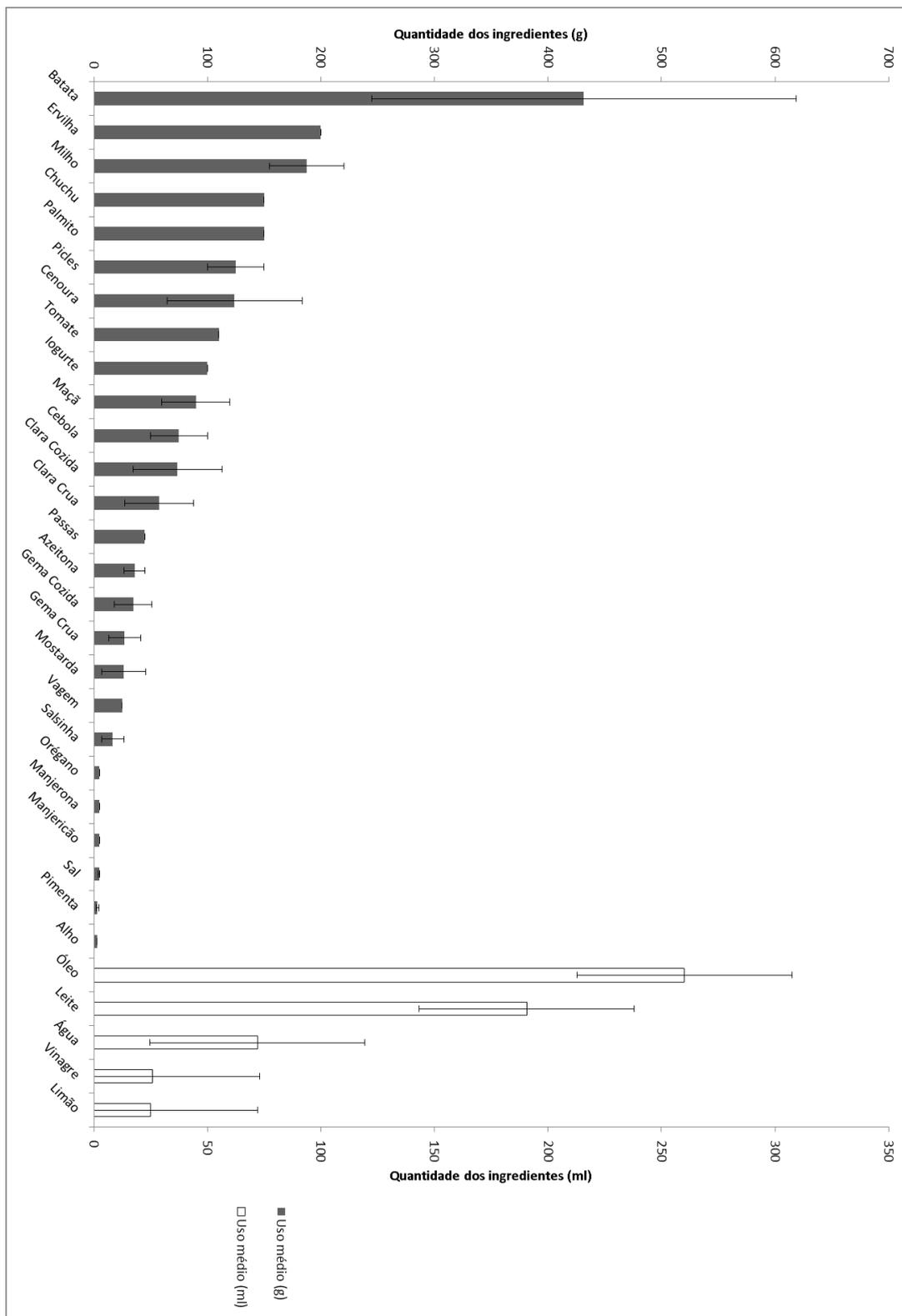


Figura 12: Média e desvio-padrão das quantidades de cada ingrediente quando usado na maionese caseira. Barras pretas mostram quantidades em gramas, enquanto que as brancas em mililitros.

A partir da Equação 7, calculou-se as quantidades dos ingredientes mais utilizados nas receitas de MC. Primeiramente, constataram-se quais eram os ingredientes mais utilizados: óleo, ovo, batata, vinagre, suco de limão e sal (Figura 11). Então se adotou como receita base: óleo, ovo e batata, devido ao expressivo número de vezes que essa combinação apareceu (328 vezes num total de 378 receitas), em relação ao ovo foram utilizadas gema crua e cozida, visto que essa foi a opção mais escolhida pelos entrevistados (51%). Para os demais ingredientes escolhidos realizaram-se todas as combinações possíveis segundo a Tabela 13. Então, aplicou-se a Equação 7, às combinações mais significativas (ponte de corte $30,0 \pm 1,0$).

Tabela 13: Número de vezes (n) que os ingredientes aparecem isoladamente na maionese caseira.

Ingrediente	n
Apenas vinagre	140
Apenas limão	29
Apenas sal	3
Vinagre e limão	30
Vinagre e sal	29
Vinagre, limão e sal	6
Limão e sal	7

Na Tabela 14 pode-se observar a composição e os valores de pH e de atividade de água das receitas mais utilizadas pelos participantes, comparadas a receita utilizada na modelagem de multiplicação de SE86 na MC. Nota-se que a atividade de água foi semelhante em todas as receitas, enquanto que o pH variou. Além disso, as receitas de 1 a 4 podem propiciar a multiplicação de SE86 ácido e termo-resistente, que como já mencionado são mais virulentas que as não resistentes.

Tabela 14: Receitas mais frequentes de maionese caseira, segundo o questionário, comparadas à receita utilizada na modelagem preditiva, abordando: composição, pH e atividade de água.

	Composição	pH	a _w
Receita 1	Gema crua (g) 12,08; Gema cozida (g) 15,66; Óleo (mL) 131,32; Batata (g) 222,64; Vinagre (mL) 12,74	4,96	1,002
Receita 2	Gema crua (g) 11,5; Gema cozida (g) 14,5; Óleo (mL) 123; Batata (g) 200; Limão (mL) 10,88	4,66	1,004
Receita 3	Gema crua (g) 11,67; Gema cozida (g) 20; Óleo (mL) 110; Batata (g) 233,33; Vinagre (mL) 15 Sal (g) 2,29	4,33	1,000
Receita 4	Gema crua (g) 10; Gema cozida (g) 16,67; Óleo (mL) 160; Batata (g) 273,33; Vinagre (mL) 13,75; Limão (mL) 13,75	4,25	1,005
Receita modelagem SE86 em MC	Gema crua (g) 20; Gema cozida (g) 20 g; Óleo (mL) 60; Batata (g) 200	6,3	0,998

A Tabela 15 apresenta práticas gerais adotadas pelos entrevistados em relação aos alimentos. Verificou-se que 94% dos entrevistados declararam higienizar as mãos antes, durante e depois de preparar alimentos, sendo que apenas 3 pessoas afirmaram não realizar a limpeza das mãos em nenhum momento no preparo de alimentos. Também em 76% dos casos os indivíduos não misturam os utensílios de alimentos crus aos e de alimentos cozidos, evitando que a contaminação dos alimentos não tratados termicamente seja transferida para os já prontos para consumo. Por fim, o principal critério para consumir um alimento armazenado foi o tempo, que é a atitude correta, porém

64% dos participantes escolheram outros critérios, o que os coloca em perigo de contrair uma DTA.

Tabela 15: Práticas gerais adotadas no preparo de alimentos, abordando limpeza de mãos, separação de utensílios e critério para consumo de alimento armazenado.

Práticas gerais	Frequên- cia n	%
Limpeza das mãos antes, durante e depois de preparar alimentos		
Faz	355	94
Não faz	3	1
Faz apenas antes	16	4
Faz apenas durante	3	1
Faz apenas depois	1	0
Total	378	100
Separação de utensílios		
Não mistura utensílios usados em alimentos crus com os de alimentos cozidos	288	76
Utiliza os mesmos utensílios ao mesmo tempo independente do tipo de alimento	90	24
Total	378	100
Principal critério para consumir um alimento armazenado		
Cheiro	122	32
Gosto	39	10
Aparência	58	15
Tempo de armazenamento	137	36
Os 4 fatores juntos	22	6
Total	378	100

A Tabela 16 apresenta as variáveis que foram estatisticamente dependentes, ou seja, estavam associadas, segundo o teste qui-quadrado de Pearson com nível de significância de 5%, sendo que as variáveis testadas foram as socioeconômicas e de Boas Práticas. Em relação à idade e ao preparo de ovo cozido, percebeu-se que a faixa etária que mais utiliza ovo parcialmente

cozido é a de 18-24 anos, enquanto que a partir dos 55 anos usam-se apenas ovos completamente cozidos, para o preparo da MC. Nesse caso, evidenciou-se que quanto maior a idade, maior foi o cuidado com o preparo dos ovos. As demais relações de faixa etária e Boas Práticas não se apresentaram significativas estatisticamente (dados não apresentados).

Quanto às variáveis que se relacionaram significativamente com a escolaridade (temperatura em que fica a MC antes de ser servida e separação de utensílios utilizados para alimentos crus e cozidos), não se observou que o aumento do grau de instrução acarretou melhores práticas. Pelo contrário, participantes com pós-graduação foram os que mais deixaram a MC em temperatura ambiente e os segundos que mais misturaram utensílios de alimentos crus com os de cozidos (dados não apresentados).

Em relação ao gênero os homens utilizaram quase quatro vezes mais ovos parcialmente cozidos do que as mulheres. Além disso, quanto ao principal critério adotado antes de se consumir um alimento armazenado, a maioria dos homens escolhe cheirar o alimento, enquanto que a maioria das mulheres adota como principal critério o tempo de armazenamento. Dessa forma, percebe-se que as mulheres apresentaram maior nível de Boas Práticas em relação aos homens em ambos os casos significativamente estatísticos (dados não apresentados).

A renda familiar apresentou-se estatisticamente relacionada com a limpeza de mãos no preparo dos alimentos, sendo que apenas em famílias com renda de 1 salário mínimo 100% dos participantes declararam lavar as

mãos antes, durante e depois do preparo de alimentos. Além disso, pessoas que afirmaram não lavar as mãos na preparação de alimentos foram pertencentes a famílias com renda de 5 salários mínimos. Dessa forma, não se pode afirmar que quanto maior a renda, maior o padrão de higiene.

Tabela 16: Variáveis estatisticamente dependentes, segundo o teste qui-quadrado de Pearson com nível de significância de 5%.

Variáveis socioeconômicas e de Boas Práticas	Valor do <i>p</i>
Faixa etária * modo de preparo do ovo cozido que é usado na MC	0,023
Grau de instrução * temperatura em que fica a MC antes de ser servida	0,038
Grau de instrução * separação de utensílios utilizados para alimentos crus e cozidos	0,029
Gênero * modo de preparo do ovo cozido que é usado na MC	0,002
Gênero * principal critério adotado antes de se consumir um alimento armazenado	0,037
Renda familiar * limpeza de mãos no preparo dos alimentos	0,03

A fim de se obter um panorama geral da adoção de Boas Práticas pelos participantes e o quanto isso os previne da ocorrência de surtos alimentares índices foram calculados. A Tabela 17 apresenta esses índices distribuídos nas categorias baixo, médio e alto, enquanto a Tabela 18 mostra o cálculo da média e do desvio-padrão deles. Percebe-se que o IBPp e o IPSp apresentaram resultados semelhantes, demonstrando que 63% e 62% dos participantes, respectivamente, enquadraram-se no nível médio de Boas Práticas e de pre-

venção de surto. Assim, equivaleria ao atendimento parcialmente conforme das práticas estudadas. Além disso, mais de 30% dos manipuladores apresentaram um nível alto desses índices, o que poderia representar metade das respostas parcialmente conforme e a outra metade em conformidade ou então 4 questões não conforme, 2 parcialmente conforme e 4 em conformidade. Entretanto esses cenários apresentam muitas inadequações para serem considerados aceitáveis.

Por isso, calculou-se o IPShp, no qual apenas 7% dos casos se enquadraram no nível alto e a maioria 66% no nível baixo. Nesse índice com uma prática não conforme que tenha peso 4, ou seja, caso se relacione ao binômio tempo e temperatura o índice já se enquadra em médio, mesmo que todas as outras práticas estejam em conformidade. Dessa forma, pode-se concluir que esse índice é bastante adequado para caracterizar cenários que possam resultar em surto de origem alimentar e também poderia ser utilizado em outros estudos, desde que um especialista ajuste os pesos das questões e das respostas corretamente segundo sua importância na possibilidade de causar surto e conformidades, respectivamente.

O valor médio do IPShp enquadrou-se no nível baixo, o que reflete a realidade da pesquisa, já que a maioria dos entrevistados cometeu alguma não conformidade em relação ao tempo e temperatura de armazenamento. Assim esses resultados apontam que a população estudada apresentou desinformação quanto às práticas adequadas de preparo e de estocagem de MC. Cabe sugerir que ações educativas destinadas à população em geral sejam feitas

periodicamente por meio de veículos de comunicação em massa, visto que são efetivas para conscientização dos consumidores e manipuladores de alimentos (Téo & Oliveira, 2005; Sanlier, 2008).

Tabela 17: Distribuição dos valores do Índice de Boas Práticas ponderado, Índice de Prevenção de Surto ponderado e Índice de Prevenção de Surto harmônico e ponderado segundo os critérios: baixo, médio e alto.

Índice	Frequência	
	n	%
Índice de Boas Práticas ponderado		
Baixo	3	1
Médio	238	63
Alto	137	36
Total	378	100
Índice de Prevenção de Surto ponderado		
Baixo	6	2
Médio	234	62
Alto	138	37
Total	378	100
Índice de Prevenção de Surto harmônico ponderado		
Baixo	251	66
Médio	102	27
Alto	25	7
Total	378	100

Tabela 18: Média e desvio-padrão de cada índice calculado.

Variável	Média	Desvio-padrão
IBPp	0,662	0,137
IPSp	0,660	0,154
IPShp	0,329	0,181

Dessa forma, apesar de vários países estabelecerem programas de vigilância e de controle para *Salmonella*, esse patógeno permanece sendo a principal causa de DTA no mundo inteiro. Há muitos alimentos envolvidos com esses surtos de origem alimentar, entretanto ovos e produtos a base deles têm

sido identificados como o veículo de *S. Enteritidis* mais frequente. No RS, *S. Enteritidis* é a principal causa de DTA, e a MC é o alimento mais envolvido nessas ocorrências.

Assim, na tentativa de melhor compreender essa problemática e de sugerir medidas de controle para produzir e, conseqüentemente, para consumir uma MC com segurança dos alimentos, esse trabalho foi desenvolvido. Para tanto em primeiro lugar, é necessário que se analise a qualidade dos ovos, verificando se eles estão limpos, livres de sujeira visível ou penas e se as cascas não estão quebradas ou rachadas. Também é importante verificar se os produtores de ovos apresentam um adequado sistema de gestão da segurança dos alimentos implementado. Visto que os ovos produzidos sem controle sanitário adequado podem apresentar maiores riscos de serem contaminados.

Após a MC ser preparada, ela deve ser mantida sob refrigeração (abaixo de 7°C), porém a RDC nº 216 de 2004 (Brasil, 2004) recomenda a conservação de alimentos sob refrigeração abaixo de 5°C, sendo esse limite mais restritivo que os resultados analisados no presente estudo. Também é muito importante que esse alimento não permaneça mais de 30 minutos a temperatura ambiente, sendo que manter essa preparação por mais tempo em temperatura ambiente foi a falha mais cometida pela população estudada no presente trabalho. No entanto, é importante salientar que caso os ovos utilizados para preparar a MC estejam altamente contaminados (acima de 10⁸ UFC/g) com *Salmonella*, o controle de temperatura e de tempo não são válidos como medida de controle, pois a MC já atingirá a dose infectante do patógeno

ao ser preparada. Com base nisso, somente os ovos adequadamente tratados termicamente (gema dura, após cocção), pasteurizados ou liofilizados adequadamente são recomendados para preparação de uma MC segura.

Outra preocupação relevante é a contaminação cruzada, por exemplo, o contato entre a casca dos ovos e o conteúdo interno deve ser minimizado ao quebrá-los. Além disso, as superfícies que entraram em contato com os ovos crus, assim como os utensílios utilizados para a sua preparação, devem ser muito bem higienizados e secos antes de serem utilizados novamente. Também, os produtos crus (especialmente carne de aves) podem ser fontes de *Salmonella*, por isso se enfatiza que os alimentos crus e cozidos devem estar sempre separados.

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A determinação dos parâmetros cinéticos de multiplicação de SE86 na MC permitiu à construção dos modelos primário e secundário que se mostraram bastante adequados após a avaliação por meio do coeficiente de determinação, do erro quadrático médio e também pela comparação com os modelos gerados no *ComBase Predictive Model* e no *Pathogen Modeling Program* 7.0, possibilitando o uso do modelo do presente estudo em outros alimentos com similares pH e Atividade de água.

Esse modelo de multiplicação de SE86 em MC foi desenvolvido a fim de melhor compreender o comportamento dessa bactéria nesse alimento em uma ampla faixa de temperatura. Observou-se que SE86 não se multiplicou a 7°C, já na MC estocada a 10°C, não houve multiplicação exponencial de SE86, nas primeiras 18h. Enquanto que a 37°C alcançou-se a dose infectante (10^6 UFC/g) em 6 h e a população final (10^9 UFC/g) em 13 h, destacando-se que a dose inicial do patógeno na MC foi baixa.

Além disso, um questionário avaliou as práticas adotadas por consumidores e por manipuladores de MC. O consumo de MC foi um hábito bastante observado entre os entrevistados, quanto ao preparo quase todos participantes afirmaram utilizar ovos, sendo que na maioria das vezes crus e os ingredientes relatados como os mais usados foram os mesmo utilizados para realizar a MC dos experimentos de multiplicação de SE86.

A análise estatística demonstrou que o gênero feminino e o aumento da idade indicam maior nível de Boas Práticas, enquanto o grau de instrução e a renda familiar, não apresentaram essa relação proporcional. Por fim, o IPShp foi elaborado para classificar o perfil dos entrevistados quanto às medidas que os prevenissem da ocorrência de surtos alimentares, sendo observado que a maioria dos participantes apresentou um nível baixo de IPShp, principalmente devido a falhas relacionadas ao binômio tempo e temperatura.

Em suma, uma MC segura poderá ser preparada, caso ovos de boa procedência sejam utilizados, sendo cozidos até atingir o estado de gema completamente dura. Além disso, o tempo de exposição em temperatura ambiente deve ser o menor possível e o armazenamento, abaixo de 7°C. Também é importante que se evite a contaminação cruzada, eliminando qualquer contato de alimentos crus com cozidos durante preparo e estocagem.

Dessa forma, os resultados obtidos nesse estudo podem ser utilizados pela Vigilância Sanitária na definição de estratégias para conscientização dos consumidores e dos manipuladores de alimentos, fornecendo bases científicas para preparação e principalmente para implementação de normas e de

legislações. Essas ações podem impactar grandemente a saúde pública, já que a implementação de programas e de ações cientificamente embasados, podem contribuir para a redução dos surtos de salmonelose ligados ao consumo de MC no RS. Assim, menos recursos financeiros públicos e privados seriam gastos, além de se reduzir impactos sociais, como a mortalidade, associados às DTA.

6 PERSPECTIVAS

A partir dos parâmetros cinéticos e dos modelos de multiplicação encontrados nesse estudo, pode-se construir um modelo de avaliação quantitativa de risco para *S. Enteritidis* SE86 e maionese caseira que seja capaz de indicar diretamente, dentre os cenários estudados, quais podem implicar em surtos, quais são os riscos e quais os principais fatores que concorrem para o risco. Dessa forma, esses resultados poderão ser utilizados pela Vigilância Sanitária por meio de recomendações de práticas a serem adotadas para reduzir essa problemática.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, C. F. **Além da carne assada sobre brasas: os elementos da experiência de consumo do churrasco.**(Dissertação de Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2010.

ANDRADE, M. A. et al. Avaliação da qualidade bacteriológica de ovos de galinha comercializados. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 4, p. 221-228, out/dez 2004.

ANVISA. **Resolução RDC n. 216.** Ministério da Saúde. Brasília, p. 25. 2004. Dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação.

ANVISA. **Cartilha sobre Boas Práticas para Serviços de Alimentação.** Brasília. 2008.

BAÚ, A. C.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Prevalência de Salmonella em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, p. 303-307, 2001.

BARANCELLI, G. V.; MARTIN, J. G. P.; PORTO, E. Salmonella in eggs: relation between production and safe consumption. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 73-82, 2012.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **Int J Food Microbiol**, v. 23, p. 277-294, 1994.

BARANYI, J.; TAMPLIN, M. L. ComBase: a combined database on microbial responses to food environments. **Journal of Food Protection** **67**, 2004. 1967–1971.

BELLOSO, W. H. et al. Recurrent Meningitis and Subarachnoid Hemorrhage Due to Salmonella in an HIV+ Patient: Case Report and Mini-Review of the Literature. **The Open AIDS Journal**, v. 5, p. 62-66, 2011.

BLASER M. J., N. L. S. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. **Rev Infect Dis**, v. 4, n. 6, p. 1096-1106, Nov-Dec 1982.

BRADEN, C. R. Salmonella enterica Serotype Enteritidis and Eggs: A National Epidemic in the United States **Clinical Infectious Diseases** , v. 43, p. 512-517, 2006.

BUCHHOLZ, U. et al. An outbreak of Salmonella München in Germany associated with raw pork meat. **J. Food Prot**, v. 68, p. 273–276, 2005.

CAMPIONI, F.; AL, E. MLVA typing reveals higher genetic homogeneity among S. Enteritidis strains isolated from food, humans and chickens in Brazil in comparison to the North American Strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, p. 174–181, 2013.

CAPALONGA, R. et al. Salmonella serotypes, resistance patterns and food vehicles of salmonellosis occurred in southern Brazil, 2007-2012. **The Journal of Infection in Developing Countries**, in press., 2014.

CARDOSO, G. T.; CARVALHO, V. M. Foodborne disease caused by Salmonella spp. **Rev. Inst. Cienc. Saúde**, v. 24, n. 2, p. 95-101, 2006.

CARVALHO, J. C. A. P. et al. Research of Salmonella Enteritidis in fresh intact shell eggs. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 13, n. 2, p. 106-108, mai/ago 2006.

CHAI, S. J. et al. Salmonella enterica Serotype Enteritidis: Increasing Incidence of Domestically Acquired Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. S5, p. 488-497, 2012.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 342-346, 2002.

CUNHA, B. **Investigação de Surtos Alimentares Ocorridos em Serviços de Alimentação no Rio Grande do Sul.** (Trabalho de conclusão de curso de Graduação) Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

CUNHA, D. T. et al. food safety of services within the destinations of the 2014 FIFA world cup in Brazil. **Food research international** , v. 57, p. 95-103, 2014.

DANTAS, R. A.; SOUZA, A. C. A.; RÉGIS, L. F. ESTUDO DE PREVALÊNCIA DE Salmonella sp EM OVOS NÃO INSPECIONADOS NA CIDADE DO SALVADOR – BAHIA. **Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC**. Florianópolis, Julho/2006.

http://www.sbpcnet.org.br/livro/58ra/senior/RESUMOS/resumo_2883.html.

DASILVA, L. et al. Development and Validation of a Predictive Model for the Growth of Vibrio vulnificus in Postharvest Shellstock Oysters. **Applied and Environmental Microbiology** , p. 1675–1681, 2012.

DDTHA - DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR/CVE/SES - SP São Paulo, Setembro 2008. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/salmonella_pergresp.htm>. Acesso em: 10 Janeiro 2014.

DI PINTO, A. et al. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods from supermarkets in Southern Italy. **New Microbiol.**, v. 33, p. 249-252, 2010.

D'AOUST, J. Y. Psychrotrophy and foodborne Salmonella. **International Journal of Food Microbiology**, v. 13, p. 207-216, 1991.

EBEL, E.; SCHLOSSER, W. Estimating the annual fraction of eggs contaminated with *Salmonella enteritidis* in the United States. **Int J Food Microbiol**, v. 61, n. 1, p. 51-62, Out 2000. (ALBRECHT, 2010)

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in laying hens. **Journal EFSA**, v. 8, n. 4, p. 1-86, 2010.

FERNANDES, S. A. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella Enteritidis* strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 59-63, 2003.

FERRER, J. et al. Review Mathematical modelling methodologies in predictive food microbiology: A SWOT analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 2-8, 2009.

FICA, A. et al. Salmonellosis outbreaks and the size and role of the Chilean State. **Rev Chilena Infectol.**, v. 29, p. 207-214, 2012.

FISBERG, R. M. et al. Food frequency questionnaire for adults from a population-based study. **Rev Saúde Pública**, v. 42, n. 3, p. 550-554, 2008.

FLÔRES, M. L. et al. Analysis of *Salmonella* in free-range eggs through polymerase chain reaction. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 3, p. 553-557, 2003.

FAO/WHO Food safety risk analysis a guide for national food safety authorities. p. 29-30.. **Report of a joint FAO/WHO meeting** Rome Itália. 2006

FORSYTHE, S. J.. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

GALDINO, V. M. C. A. **Pesquisa de *Salmonella* spp. em lotes de galinhas de postura comercial vacinadas e não vacinadas contra *Salmonella Enteritidis***.(Dissertação de Mestrado) UNESP. Jaboticabal/SP, p. 123. 2010.

GANTOIS, I. et al. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella Enteritidis*. **FEMS Microbiol**, v. 33, p. 718-738, 2009.

GEIMBA, M. P. et al. Serological characterization and prevalence of spvR genes in Salmonella isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1229-1233, 2004.

GEIMBA, M. P.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Antimicrobial Resistance in Salmonella Enteritidis Isolated from Foods Involved in Human Foodborne Outbreaks Occurred in the South of Brazil, 1999 to 2000. **Journal of Food Safety**, v. 25, n. 3, p. 173-182, 2005.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. **World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella**, Paris, n. 9, 2007.

GUERRA, C. B.; MIGUEL, D. P. Positive staphylococcus coagulase and fecal coliforms in cold salads added to mayonnaise sauce. **Food Research International**, v. 1, p. 11-15, 2010.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003-2007 (No.47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, n. 1, p. 26-29, 2010.

GUMUDAVELLI, V. et al. Dynamic Predictive Model for Growth of Salmonella Enteritidis in Egg Yolk. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 254-262, 2007.

GURTLER, J. B.; CONNER, D. E. Survival and Growth of Salmonella Enteritidis in Liquid Egg Products Varying by Temperature, Product Composition, and Carbon Dioxide Concentration. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, p. 561-567, 2009.

HENDRIKSEN, R. S. et al. Global monitoring of Salmonella serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 8, p. 887-900, 2011.

HUMPHREY, T. J. Salmonella, stress responses and food safety. **Science and Society**, v. 2, p. 504-509, 2004.

HUMPHREY, T. J. et al. Numbers of Salmonella enteritidis in the contents of naturally contaminated hens' eggs. **Epidemiol. Infect.**, Great Britain, v. 106, p. 489-494, 1991.

ISO 6579 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Salmonella spp.** Switzerland. 2002.

KOTTWITZ, L. B. M. et al. Commercially laid eggs vs. discarded hatching eggs: contamination by Salmonella spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 367-370, 2013.

LANCIOTTI, R. et al. Growth/no growth interfaces of Bacillus cereus, Staphylococcus aureus and Salmonella Enteritidis in model systems based on

water activity, pH, temperature and ethanol concentration. **Food Microbiology**, v. 18, p. 659-668, 2001.

LEAL, D. **Práticas adotadas pelo consumidor na compra e utilização do ovo na alimentação.**(Dissertação de Mestrado) Universidade de São Paulo. [S.I.]. 2011.

MÜRMAN, L. et al. Quantification and Molecular Characterization of Salmonella Isolated from Food Samples Involved in Salmonellosis Outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** , v. 39, p. 529-534 , 2008.

MACHADO, T. R. M. et al. Avaliação da Resistência de Salmonella à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, p. 475-481., 2010.

MALHEIROS, P. S.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Acid and thermal resistance of a Salmonella Enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 302-317, 2008.

MALHEIROS, P. S.; DE PAULA, C. M. D.; TONDO, E. C. Cinética de crescimento de Salmonella Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com linhagens de outros sorovares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 751-755, 2007.

MARTINKO et al. **Microbiologia de Brock**. 12^a. ed. [S.I.]: Artmed, 2010.

MATCHES, J. R.; LISTON, J. Low temperature growth of Salmonella.. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 641-645, 1968.

MCKELLAR, R. C.; DELAQUIS, P. Development of a dynamic growth–death model for Escherichia coli O157:H7 in minimally processed leafy green vegetables International. **Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 7-14, 2011.

MCKELLAR, R. C.; LU, X. Primary models: Modeling Microbial Responses in Foods. [S.I.]: InCRC Press, Boca Raton. Cap. 2, p. 21–62. 2004

MCMEEKIN, T. et al. The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 2-9, 2008.

MOTA, C. C. S. et al. Toxi-infecção alimentar por Salmonella enteritidis. Relato de um surto ocorrido em Curitiba-PR, Brasil/julho de 1981. **Higiene Alimentar** , v. 2, p. 123-131, 1983.

NORTON, S. et al. A large point-source outbreak of Salmonella Typhimurium linked to chicken, pork and salad rolls from a Vietnamese bakery in Sydney. **Western Pac Surveill Response J.**, v. 21, p. 16-23, 2012.

OH, D. H.; DING, T.; JIN, Y. G. A New Secondary Model Developed for the Growth Rate of Escherichia coli O157:H7 in Broth. **Indian J Microbiol**, v. 52, p. 99-101, 2012.

OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. N. Salmonella in table eggs: Occurrence in retails, storage conditions and eggshell disinfections. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 6, Dez 2000.

OLIVEIRA, F. A. et al. Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of Salmonella Enteritidis involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. **J. Infect. Dev. Countries**, v. 1, p. 170-176, 2007.

OLIVEIRA, F. A. et al. Clonal relationship among Salmonella enterica serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. **Food Control**, v. 20, p. 606-610, 2009.

OLIVEIRA, F. A. et al. Characterization of Salmonella Enteritidis isolated from human samples. **Food Research International**, v. 1, p. 2-5, 2010.

OLIVEIRA, S. P. Study of food consumption: in search of a multidisciplinary approach Annie Thébaud-Mony. **Rev. Saúde Pública**, v. 31, n. 2, p. 201-208, 1997.

OLIVEIRA, V. L.; TAHAM, T. Pesquisa de Salmonella spp. em Ovos Comercializados na Região do Distrito Federal. **Cadernos de Pós-graduação da Fazu**, v. 2, 2011.

PAPAMICHALIS, P. et al. Salmonella enteritidis Infection Complicated by Acute Myocarditis: A Case Report and Review of the Literature. **Cardiology Research and Practice**, p. 6, 2011.

PAULA, C. M. D. et al. Antimicrobial resistance in Salmonella Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in Southern Brazil from 2003 to 2006. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v. 3, p. 233-240, 2011.

PEREZ, K. J. et al. Evaluation of intestinal invasion in germ free mice challenge with acid-adapted and non acid-adapted Salmonella Enteritidis SE86 and Salmonella Typhimurium ST99. **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 1, p. 108-114, 2012.

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

RIO GRANDE DO SUL. **Portaria n. 78 de 28 de janeiro de 2009. Aprova a lista de verificação em boas práticas para serviços de alimentação, aprova normas para cursos de capacitação em boas práticas para serviços de alimentação e dá outras providências.** Secretaria da Saúde. Porto Alegre, p. 35. 2009. Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul, 30 jan. 2009.

RIO GRANDE DO SUL. Atlas Socioeconômico do Estado do Rio Grande do Sul. **SEPLAG**, 2014. Disponível em: <<http://www1.seplag.rs.gov.br/atlas/default.asp>>. Acesso em: Janeiro 2014.

RITTER, A. C. et al. Investigation of rpoS and dps genes in sodium hypochlorite resistance of Salmonella Enteritidis SE86 isolated from foodborne illness outbreaks in Southern Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 3, p. 437-442, Mar 2012.

RODRIGUES, K. R. M.; SALAY, E. Attitudes of Grangers, Wholesalers, Retailers and Consumers toward the Sanitary Quality of in Natura Chicken Eggs. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 185-193, set/dez 2001.

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

SÃO PAULO. **Portaria CVS n. 05, de 19 de abril de 2013. Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação, e o roteiro de inspeção, anexo.** Secretaria da Saúde. São Paulo, p. 32. 2013. Diário Oficial do Estado de São Paulo, 19 abr..

SALLES, R. P. R. **Pesquisa de Salmonella spp. em Galinhas Poedeiras e Enterobactérias em Ovos Comerciais da Região Metropolitana de Fortaleza.**(Tese de Doutorado) Universidade Estadual do Ceará Fortaleza. 2007.

SANLIER, N. The knowledge and practice of food safety by young and adult consumers. **Journal Food Control**, Amsterdam, v. 20, p. 538-542, 2008.

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

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerg. Infect. Dis.** , v. 17, p. 7-15, 2011.

SEIXAS, F. R. F. **Verificação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise da Qualidade Microbiológica de Saladas Adicionadas de Maionese Comercializadas na Cidade de São José do Rio Preto – SP.** (Dissertação de Mestrado) UNESP - Campus de São José do Rio Preto. São Paulo. 2008.

SHINOHARA, N. K. S. et al. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 1675-1683, 2008.

SILVEIRA, J. B.; TONDO, E. C. Salmonellosis outbreaks occurring in Rio Grande do Sul, Southern Brazil, during 2000 to 2001. **International**

Symposium Salmonella and Salmonellosis, Saint-Malo, v. 1, p. 521-522, 2006.

SINGH, A. et al. Dynamic Predictive Model for the Growth of Salmonella spp. in Liquid Whole Egg. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 225-232, 2011.

SIRINAVIN, S.; JAYANETRA, P.; THAKKINSTIAN, A. Clinical and prognostic categorization of extraintestinal nontyphoidal Salmonella infections in infants and children. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, p. 1151-1156, 1999.

STEIN-ZAMIR, C. et al. Salmonella enterica outbreak in a banqueting hall in Jerusalem: the unseen hand of the epidemiological triangle. **Isr Med Assoc J.**, v. 11, p. 94-97, 2009.

SVS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos, Abril 2013. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/cmads/audiencias-publicas/audiencia-publica-2013/crueldade-a-que-os-animais-de-producao-sao-expostos-em-abatedouros-municipais/apresentacao>>. Acesso em: 02 Dezembro 2013. Brasília, Brasil.

TÉO, C. R. P. A.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Salmonella spp.: The egg as vehicle of transmission and the implications of antimicrobial resistance for public health. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 195-210, abr/jun 2005.

TONDO, E. C. et al. Adhesion and biocides inactivation of Salmonella on stainless steel and polyethylene. **Brazilian Journal of Microbiology**, 4, 10-20., v. 4, p. 10-20, 2010.

TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2014.

TONDO, E. C.; RITTER, A. C. Salmonella and Salmonellosis in Southern Brazil: a Review of the Last Decade. In: **Salmonella: classification, genetics and disease outbreaks**. [S.l.]: [s.n.], 2012.

TSOLIS, R. M. et al. Minireview - How To Become a Top Model: Impact of Animal Experimentation on Human Salmonella Disease Research. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 5, p. 1806-1814, 2011.

VIDAL, E. et al. Automated peritoneal dialysis-related peritonitis due to Salmonella enteritidis in a pediatric patient. **Japanese Society of Nephrology**, , 2011. Published online.

WAGNER, V. R.; SILVEIRA, J. B.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul State, Southern Brazil, 2002 to 2004. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 723-729, Jan 2014.

WANG, H. Y. et al. Leuconostoc Mesenteroides Growth in Food Products: Prediction and Sensitivity Analysis by Adaptive-Network-Based Fuzzy Inference Systems. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1-16, 2013.

WATTIAU, P.; BOLAND, C.; BERTRAND, S. Minireview - Methodologies for Salmonella enterica subsp. enterica Subtyping: Gold Standards and Alternatives. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 22, p. 7877–7885, 2011.

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

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health topics — Salmonella, 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acesso em: 2014.

ZHANG, G.; BROWN, E. W.; HAMMACK, T. S. Comparison of different preenrichment broths, egg:preenrichment broth ratios, and surface disinfection for the detection of Salmonella enterica ssp. enterica serovar Enteritidis in shell eggs. **Poult Sci.**, v. 92, p. 3010-3016, 2013.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the bacterial growth curve. **Appl Environ Microbiol.** , v. 56, p. 1875-1881, 1990.

ZWIETERING, M. H.; BESTEN, H. M. W. D. Modelling: One word for many activities and uses. **Food Microbiology** , v. 28, p. 818-822, 2011.

Apêndice 1: Questionário

Questionário sobre práticas de preparado, de estocagem e de consumo de maionese caseira

A salada de maionese caseira é o principal alimento causador de salmonelose no Rio Grande do Sul, que é a doença transmitida por alimento de maior incidência no Estado. Por esse motivo, estamos realizando uma pesquisa científica para saber como prevenir essa doença. As informações que você fornecerá serão de grande importância, logo tente respondê-las da forma mais precisa possível. Todas as informações fornecidas são estritamente confidenciais.

Selecione uma alternativa.

1. Sua faixa etária
 - a. menos de 18 anos
 - b. 18-24
 - c. 25-34
 - d. 35-44
 - e. 45-54
 - f. 55-64
 - g. 65 ou mais

2. Seu nível de instrução
 - a. Ensino fundamental incompleto
 - b. Ensino fundamental completo
 - c. Ensino médio incompleto
 - d. Ensino médio completo
 - e. Ensino superior incompleto
 - f. Ensino superior completo
 - g. Pós-graduação incompleta
 - h. Pós-graduação completa

3. Sua raça
 - a. Branco
 - b. Negro
 - c. Amarelo
 - d. Pardo
 - e. Índio

4. Sexo
 - a. Masculino
 - b. Feminino

5. Você é o principal responsável pela renda familiar?
 - a. Sim.
 - b. Não, mas contribuo.

c. Não contribuo.

6. Tipo de habitação

- a. Própria
- b. Alugada
- c. Empréstada

7. Escreva em que cidade você mora?

a. _____

Selecione uma alternativa.

8. Renda familiar aproximada

- a. Menos de 1 salário mínimo
- b. 1 salário mínimo
- c. 2 salários mínimos
- d. 3 salários mínimos
- e. 4 salários mínimos
- f. 5 salários mínimos
- g. Mais de 5 salários mínimos

9. Estado civil

- a. Casado (a)
- b. Solteiro (a) (nunca se casou)
- c. Divorciado (a)
- d. Viúvo (a)
- e. Separado (a)

10. Regime de trabalho atual

- a. Trabalho como assalariado
- b. Sou autônomo
- c. Sou proprietário ou sócio de uma empresa
- d. Trabalho sem remuneração em uma empresa familiar
- e. Estou desempregado, temporariamente demitido, mas à procura de trabalho
- f. Aposentado
- g. Deficiente
- h. Dona de casa
- i. Estudante
- j. Não trabalho

11. Quando foi a última vez que você comeu SMC?

- a. Na semana passada
- b. No mês passado
- c. Mais de 1 mês, mas nos últimos 6 meses
- d. Mais de 6 meses atrás, mas nos últimos 12 meses

- e. Mais de um ano atrás
- f. Não consumo SMC

12. Você prepara a SMC?

- a. Sim
- b. Não

13. Com que frequência você consome SMC?

- a. No mínimo 1 vez por dia
- b. No mínimo 1 vez por semana
- c. No mínimo 1 vez por mês
- d. No mínimo 1 vez a cada 6 meses
- e. No mínimo 1 vez por ano
- f. Não consome

14. Que quantidade de SMC você consome de cada vez?

- a. Menos de 1 colher de sopa
- b. 1 colher de sopa (40 gramas)
- c. 2 colheres de sopa (80 gramas)
- d. 3 colheres de sopa (120 gramas)
- e. 4 colheres de sopa (160 gramas)
- f. Mais de 4 colheres de sopa
- g. Não consome

15. A maionese utilizada no preparo da SMC é feita com ovo?

- a. Sim, utilizo ovo cru inteiro (clara e gema)
- b. Sim, utilizo ovo inteiro cozido
- c. Sim, utilizo só a gema crua
- d. Sim, utilizo só a gema cozida
- e. Sim, utilizo a gema crua e a gema cozida
- f. Não, utilizo ovo

16. Caso você utilize ovos ou gemas cozidas no preparo da maionese caseira, como fica aparentemente esses ingredientes:

- a. Gema ainda mole ou parcialmente mole
- b. Gema completamente dura (totalmente cozida)

17. Quais os ingredientes da SMC? (Selecione todas que se aplicam)

- a. Ovo
- b. Azeite/óleo
- c. Batata
- d. Outros (especifique)

18. Qual é a quantidade de cada um dos ingredientes da SMC citados acima? (assinale a quantidade de cada item)

- a. Gema crua 0 1 2 3 4 5
- b. Gema cozida 0 1 2 3 4 5

- c. Clara crua 0 1 2 3 4 5
- d. Clara cozida 0 1 2 3 4 5
- e. Azeite/óleo 0 ½ , 1, 1 e ½ , 2 , 2 e ½, 3 xícaras de chá
- f. Batata média 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
- g. Outros (especifique o ingrediente e a quantidade)

19. Quanto tempo antes de servir é preparada a SMC?

- a. Menos de 30 minutos
- b. De 30 min a 1 hora
- c. Mais de 1 hora, mas menos de 2 horas
- d. De 2 a 6 horas
- e. Mais de 6 horas

20. Até servir, a SMC fica onde?

- a. Na geladeira
- b. No *freezer*
- c. Em temperatura ambiente

21. Por quanto tempo a SMC fica servida em cima da mesa (durante a refeição)?

- a. Menos de 30 minutos
- b. De 30 min a 1 hora
- c. Mais de 1 hora, mas menos de 2 horas
- d. De 2 a 6 horas
- e. Mais de 6 horas

22. A SMC não consumida após o término da refeição é reaproveitada?

- a. Sim
- b. Não

23. Por quanto tempo é reaproveitada a SMC, após seu preparo?

- a. Menos de 1 dia
- b. 1 dia
- c. 2 dias
- d. 3 dias
- e. 4 dias
- f. 5 dias ou mais

24. É reaproveitada de uma só vez ou por porção?

- a. Uma só vez
- b. Em porções

25. A SMC que será reaproveitada fica guardada ...

- a. Na geladeira
- b. No *freezer*
- c. Em temperatura ambiente

26. O recipiente onde fica a SMC é tampado?
- Sim, o tempo todo, retirando-se a tampa apenas para servir-se
 - Sim, porém só quando fica armazenado na geladeira, *freezer* ou temperatura ambiente
 - Não
27. Para decidir se vai comer um alimento que tenha sido armazenado na geladeira/*freezer*/temperatura ambiente, qual o fator mais importante?
- cheiro
 - gosto
 - aparência
 - tempo de armazenamento
 - Outros (especifique)
28. Você costuma higienizar as mãos antes, durante e depois de preparar um alimento?
- Sim
 - Não
 - Apenas antes
 - Apenas durante
 - Apenas depois
29. Em relação aos utensílios utilizados durante o preparo dos alimentos:
- Não mistura utensílios de alimentos crus e de alimentos cozidos
 - Utiliza os mesmos utensílios independente do tipo de alimento

Obrigado por ter tempo para concluir esse questionário, suas informações são de grande importância para nós.

APÊNDICE 2: Artigo Científico

Artigo científico que será submetido à revista *Food Microbiology* como “short research notes”.

Modeling growth kinetic parameters of *Salmonella* Enteritidis SE86
on Homemade Mayonnaise

Susana de Oliveira Elias¹, Anderson S. Sant’Ana²
and Eduardo Cesar Tondo¹

¹Department of Food Sciences, Institute of Food Science and Technology - ICTA, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS

²Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, University of Campinas - UNICAMP

Corresponding Author: Susana de Oliveira Elias

E-mail: susanaelias@gmail.com

Postal Address: Avenida Bento Gonçalves, 9500 – Campus do Vale –
Prédio 43212 – CEP 91501-970 - Porto Alegre/RS/Brasil

Phone/fax: 55-51-33086677

Abstract

During the last decade, a specific strain of *Salmonella* Enteritidis (SE86) has been identified as the major etiological agent responsible for salmonellosis in the State of Rio Grande do Sul (RS), Southern Brazil, and the main food vehicle was homemade mayonnaise (HM). This study aimed to model the growth prediction of SE86 on HM. SE86 was inoculated on HM and stored at 7, 10, 15, 20, 25, 30 and 37°C. Growing curves were built by fitting data to the Baranyi's DMFit, generating R² values greater than 0.98 for primary models. Secondary model was fitted with Ratkowsky equation, generating R² and RMSE values of 0.99 and 0.016, respectively. Experimental data showed that SE86 did not grow on HM at 7°C, for 30 days. At 10°C, no growth was observed until approximately 18 h and the infective dose (10⁶ CFU) was reached after 8.1 days. However, the same numbers of SE86 were attained after 6 h at 37°C. Experimental data demonstrated smaller *lag* phases than those generated by ComBase Predictive Models, suggesting that SE86 is very well adapted for growing on HM. In conclusion, the developed model can be used to predict the growth of SE86 on HM under various temperatures and HM can be produced if safe eggs were used and HM were stored below 7°C.

Key-words: *Salmonella*, homemade mayonnaise, growth prediction, predictive model

Highlights

- ✓ *Salmonella* Enteritidis SE86 is the most important agent of salmonellosis in Southern Brazil;
- ✓ Homemade mayonnaise (HM) was identified as the principal food vehicle linked to salmonellosis in Southern Brazil;
- ✓ A model was developed to predict the growth of SE86 on HM as affected by temperature;
- ✓ This model is able to predict the growth of SE86 at different temperatures on HM.

1. Introduction

Salmonellosis is the foodborne illness with the major incidence worldwide (Scallan et al., 2011). This disease usually causes a self-limiting gastroenteritis, however severe infections such as bacteremia, meningitis, peritonitis and myocarditis have also been reported (Papamichalis et al., 2011; Matheson et al., 2009; Asseva et al., 2012). In Brazil, *Salmonella* spp. was the principal cause of foodborne outbreaks in the last decade, being responsible for 40% of the notifications (Anonymous, 2013). Egg products have been identified as the main food preparation involved with salmonellosis in Brazil (Anonymous, 2013). In Rio Grande do Sul (RS), southernmost State of Brazil, homemade mayonnaise (HM) was identified as the food vehicle mostly involved with salmonellosis. These data assume great importance, because RS has notified an expressive part of the information related to foodborne outbreaks occurred in Brazil in the last years (Anonymous, 2010).

In the State of RS, from 1999 to 2006, *S. Enteritidis* isolated from several foodborne outbreaks demonstrated a clonal relationship after being analyzed by PCR-ribotyping, RAPD, PFGE and DNA sequencing analysis (Oliveira et al., 2007). This strain was responsible for more than 95% of salmonellosis occurred in RS and was named *S. Enteritidis* SE86 (Geimba et al., 2004; Oliveira et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Tondo and Ritter, 2012). SE86 has been demonstrated to experience increasing resistance to nalidixic acid and to ampicillin (Geimba et al., 2005; Oliveira et al., 2009; Paula et al., 2011), to be able to form biofilms on stainless steel and polypropylene (Tondo et al., 2010), to survive in 200 ppm sodium hypochlorite for 15 minutes (Machado et al., 2010) and to express RpoS and Dps proteins after exposure to sodium hypochlorite (Ritter et al., 2012). SE86 grew faster during the first 6 h on HM when compared with *S. Typhimurium* and *S. Bredeney* (Malheiros et al., 2007). Moreover, after exposure to sub-lethal pH (pH 4.0), SE86 became acid-adapted and demonstrated to be more acid-and-thermal-resistant than other *Salmonella* serovars (Malheiros et al., 2008). Acid-adapted SE86 presented higher virulence than non-acid-adapted SE86 and acid-adapted *S. Typhimurium* in germ-free mice and these

characteristics could be related with its frequent involvement in salmonellosis (Perez et al., 2012).

It is well known that eggs and egg products are among the most important food vehicles of *S. Enteritidis*, because the outer shell egg surfaces or the internal egg contents can be contaminated (Zhang et al., 2013). In general, the external contamination is due to chicken faeces during or after oviposition, on the other hand the internal infection can be the result of penetration through the eggshell or by direct contamination of egg contents before oviposition, originating from reproductive organs infection (Gantois et al., 2009). Mayonnaise, often prepared with raw eggs, is widely consumed and probably the most used sauce around the world (Guerra and Miguel, 2010). It is a food preparation frequently involved with foodborne outbreaks worldwide (Fica et al., 2012; Norton et al., 2012; Di Pinto et al., 2010; Stein-Zamir et al., 2009). In the State of RS, HM prepared with raw eggs and mixed with cooked potato is the principal side dish of *churrasco*, a typical meal similar to barbecue, highly consumed in this region of Brazil (Albrecht, 2010).

Predictive microbiology uses mathematical models to describe the microbial growth kinetics. It is also an important tool in quantitative microbial risk assessments as it allows understanding the behavior of microorganisms as affected by several factors in the food chain (McMeekin et al., 2008). In order to allow the development of a quantitative microbial risk assessment for *Salmonella* Enteritidis and HM, the current study was performed aiming at modeling the growth of SE86 on HM kept at different temperature conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Strain

SE86 was isolated from cabbage salad associated with salmonellosis outbreak occurred in the State of RS in 1999. The strain belongs to the Culture Collection of the Laboratory Food Microbiology and Food Control (ICTA/UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

2.2. Ingredients and Preparation of HM

All ingredients were acquired from a supermarket in Porto Alegre city, Brazil. Only eggs without cracks and with no visible contamination were used. Before use, eggs were immersed in 70% ethanol solution for 30 minutes, in order to allow surface decontamination. Then, eggs were aseptically broken and the yolks were placed in a sterile glass beaker. An aliquot of 25 g of pooled yolks was tested for the presence of *Salmonella* spp. following ISO 6579 in order to ensure this microorganism was absent (Anonymous, 2002). Whole eggs were boiled for 10 minutes, until the yolks became totally cooked and solid. White potatoes were peeled, chopped and cooked. After that, potatoes were immediately cooled down in a tightly sealed sterile pot until they reached 7°C.

The HM recipe was based on Malheiros et al. (2007). Briefly, HM was prepared using 20 g of raw and 20 g of cooked egg yolks, 60 mL of pure soybean oil and 200 g of cooked potatoes. First, eggs yolks were homogenized with oil under continuous and manual mixing until an emulsion has been formed. Then, cooked potatoes were added and mixed with mayonnaise. All procedures were performed in a laminar flow cabinet and the final mayonnaise salad had pH = 6.3 ± 0.2 and water activity (a_w) = 0.998 ± 0.003 . The pH of HM may vary according to the use of acidifiers as vinegar and lemon juice, but the recipe used in this study included only the most commonly used ingredients. In order to test microbial contamination, 25 g of HM were homogenized in 225 mL of buffered peptone water (Merck, Darsmtadt, Germany) in a stomacher plastic bag and further plated onto 3M™ Petrifilm™ aerobic count plate and on 3M™ Petrifilm™ *Enterobacteriaceae* count plate. Incubation was at 37°C for 24 h and expression of results was performed as indicated by the manufacturer.

2.3. SE86 inoculation on HM

Cell suspension of SE86 was prepared as described by Sant'Ana et al. (2012) with few modifications. Briefly, SE86 was grown in 5 mL of Brain Heart Infusion broth (BHI) at 37°C for 24h. The culture was centrifuged at 4°C for 10 min at 2810g, the supernatants were discharged and pellets were washed with 0.1% peptone water. This procedure was repeated 3 times and then, in the third repetition, cells were re-suspended in 0.1% peptone water and final cell concentration was adjusted through optical density (OD_{630nm}) and plate count at 10^8

CFU/mL. Decimal serial dilutions in 0.1% peptone water were prepared and SE86 was inoculated to reach a final concentration on HM of nearly 20 CFU/g (1.0-1.6 log CFU/g). This inoculum was chosen to simulate a low contamination, which should be the contamination when the outbreaks occur. All culture media used were from Merck (Darsmtadt, Germany).

2.4. Storage Conditions and Enumeration of SE86 on HM

Inoculated portions of HM were stored at 7, 10, 15, 20, 25, 30 and 37°C, in a tightly sealed sterile glass beaker, for different periods in order to simulate the whole temperature range HM can be exposed after preparation. Sampling was carried out in varied time intervals, depending on the storage temperature. At each time point, 10 g of sample were homogenized in 90 mL of buffered peptone water (Merck, Darsmtadt, Germany), following decimal dilution in 0.1% peptone water (Merck, Darsmtadt, Germany). Then, aliquots were plated onto 3M™ Petrifilm™ aerobic count plate and on Xylose Lysine Deoxycholate agar (Merck, Darsmtadt, Germany), following incubation at 37°C for 18-24 h. In the case of *Salmonella* Enteritidis enumeration, at least three typical colonies per collection point were selected for confirmation using *Salmonella enterica* polyvalent serum. The limit of enumeration of the method used was 10¹ CFU/g. All the bacterial counts were carried out in triplicate. The experiments were repeated three times and the results were expressed as log CFU/g.

2.5. Modeling growth parameters of SE86 on HM

The predictive primary model described by Baranyi and Roberts, (1994) was used in this study to calculate the growth kinetic parameters of SE86 on HM. The growth curves for each temperature were built by fitting data to the Baranyi's DMFit version 2.1 Excel® add-in (www.ifr.ac.uk/safety/DMfit). The following parameters were obtained: maximum growth rate, lag time and maximum population density. Baranyi and Roberts, (1994) model is shown in Equations 1 – 3.

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

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

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

where: $\ln(N(t))$ = log of cell concentration at time t [h] (CFU/g); $\ln(N_0)$ = log of initial cell concentration (CFU/g); μ_{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 $t = t_0$; λ = lag time (h).

The predictive secondary model was built using the square root model described by Ratkowsky et al. (1982) to describe μ and λ 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, b is the slope of the regression line, T (°C) is temperature and T_0 (°C) is a conceptual minimum temperature for microbial growth.

2.6. Model evaluation

Measures of coefficient of determination (R^2) and root mean square error (RMSE) were used to evaluate the performance of the models built in this study. The R^2 (Equation 5) is generally considered as an overall measure of the prediction calculated by developed model, and the closer to 1 the better the model's performance. The RMSE (Equation 6) is used to offer a standard measurement of goodness-of-fit of a model to the data used to produce it. A RMSE of 0 indicates the best possible fit between predicted and observed values (Oh et al., 2012; Wang et al., 2013).

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^N \hat{y}_i^2} \quad \text{Equation 5}$$

where: \bar{N} is the number of the points in the data set, y_i is the observed value, and \hat{y}_i is the prediction value.

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum(\mu - \hat{\mu})^2}{n}} \quad \text{Equation 6}$$

where: n is the number of observations, μ is the observed value, and $\hat{\mu}$ is the predicted value.

In addition, ComBase Predictor (<http://modelling.combase.cc/>) was used to estimate the growth parameters of *SE86* on HM for further comparison with the data obtained in this study. The ComBase model was run with the similar parameters of HM. In ComBase, pH = 6.33, $a_w = 0.998$, initial level was 1 log CFU/mL of the microorganism, nitrite (ppm) = 0 were used and “salmonellae with nitrite (ppm)” was the static growth model chosen.

3. Results and Discussion

The pooled raw yolks used in this study were negative for *Salmonella* spp. In addition, all HM samples tested for microbial contamination before the pathogen inoculation showed no microbial growth, ensuring that HM was free of viable microorganisms.

All growth curves started with an initial population of approximately 1.0 - 1.6 log CFU/g of *SE86* and final populations varied between 6 and 9 log CFU/g. According to our results, *SE86* survived, but it did not grow on HM stored at 7°C for 30 days, *SE86* population varied from 1 to 2 log CFU/g in this period. It is known that *Salmonella* spp. growth at lower temperatures is dependent on the strain, as well as the culture media. Thus, the lack of growth of *SE86* on HM at 7°C could be due to a combination of factors, including the presence of microbial inhibitors (ovotransferrin, ovomucin, cystatin and avidin) on the HM ingredients (albumen vestige) and the effect of low temperature (Singh et al., 2011). For the similar reasons, survival but not growth of *S. Enteritidis* in egg products at 7°C has been reported by Gurtler and Conner (2009) and Singh et al. (2011). Despite this, some strains of *Salmonella* spp. have

been shown to be able to grow at low temperatures such as 5.9°C in complex broth, 2.0°C on fresh meats, 4.0°C on agar and on shell eggs (D'Aoust, 1991). According to Matches and Liston (1968) *Salmonella* spp. is able to growth at temperatures from 5.3 to 46.2°C, with optimum growth between 35 and 37°C. As reported by Lanciotti et al. (2001), 4.69°C was the minimum temperature for *S. Enteritidis* to grow, which was determined by a growth/ no growth interface model. Therefore, it should be highlighted that although growth at 7°C was not observed in this study, it does not mean that all occasions SE86 will not grow on HM at this temperature. Herein, we have used a kinetic modeling approach, but depending on a series of factors, different probabilities of growth at this limit condition may be obtained.

Table 1 presents the growth parameters (growth rate, *lag* time and final population) of SE86 on HM, at different temperatures, as estimated by DMFit and also parameters predicted by ComBase Predictive Models. The comparison of the results demonstrated that the growth rates observed on HM generated by microbiological experiments and DMFit were very similar to the growth rates modeled by ComBase, *Lag* phases values were smaller on HM than in ComBase, which is already known to be due to the fact that ComBase considers growth of *Salmonella* spp. in broth culture, while our data was generated using growth of a specific strain of *Salmonella* (SE86) and specific food preparation, i.e. HM. Another possibility is that SE86 is very well adapted to growth on HM.

The final population of SE86 on HM varied from approximately 10^6 CFU/g at 10°C up to 10^9 CFU/g at other temperatures (except 15°C = 10^8 CFU/g). In Figure 1, it is possible to observe when the final population of SE86 on HM was reached. At 37°C, a final population of 10^9 CFU/g was observed after 13 h, at 30°C the maximum density of cells was reached at 19 h, at 25°C in 23.5 h, at 20°C in 2.25 days, at 15°C in 4.75 days and at 10°C after 10 days. The growth parameters of SE86 on HM were very similar to those demonstrated by Gumudavelli et al. (2007) who have tested *S. Enteritidis* growing on egg yolk. Singh et al. (2011) have modeled *Salmonella* spp. in liquid whole egg, demonstrating slower growth rates than SE86 on HM.

According to Humphrey (2004), the typical infective dose for *Salmonella* spp. is $10^6 - 10^8$ CFU, however several outbreaks has shown that this dose can be substantially lower as 10^0 CFU. Assuming an infective dose of 10^6 CFU, SE86 growing on HM could cause salmonellosis only after 6 h at 37°C , which is a possible scenario in the summertime at the State of RS. In this Brazilian State, very often, large amounts of HM are prepared to popular festivities, forcing anticipated preparation. Because this large amounts of HM require a lot of space inside refrigerators, frequently HM is maintained at room temperature for several hours, providing time and temperature for *Salmonella* Enteritidis growth. Nevertheless, the initial concentration of SE86 used in our study was low, if it were higher; the infective dose would be reached faster, explaining salmonellosis outbreaks after few hours of temperature abuse. Corroborating these information, Malheiros et al. (2007) have compared the growth of SE86, *S. Bredeney* and *S. Typhimurium* on HM at 30°C , and it was observed that SE86 has grown faster than the other serovars, during the first 6 h. The frequent isolation of *S. Enteritidis* from poultry or eggs products and the rapid multiplication ability of SE86 growing on HM, may explain the great association of this microorganism in RS outbreaks involving HM.

At 30°C , SE86 took 8.3 h to reach 10^6 CFU, at 25°C it was necessary 12 h, at 20°C one day, at 15°C 2.3 days and at 10°C 8.1 days. All those conditions are not common to happen during HM preparation and consuming, because normally HM remains less than 8 hours without refrigeration and it is consumed in maximum 3 days after its preparation (data not shown).

Figure 1 exhibits the fitting experimental data to the Baranyi model. The R^2 values for growth curves of SE86 on HM to Baranyi model was higher than 0.98 (data not shown). Based on these results, it is clear that there is a good fit between the experimental data and the primary model. Therefore, the data obtained in primary model (the values of maximum growth rate and lag time) were used to elaborate a secondary model (Table 2), which allowed the prediction of the parameters (growth rate) described on the basis of the temperature variation. The goodness-of-fit of a predictive model is usually characterized by the root mean square error (RMSE), which was 0.016 in our model. Besides, the

coefficient of determination (R^2) was 0.9967, confirming the precision of our model. Based on these results, our model is adequate for modeling the growth of *S. Enteritidis* on HM under various temperature conditions and it also may be adequate to be used for predicting the SE86 growth on eggs and eggs products.

Despite of several countries have established *Salmonella* spp. surveillance and control programs, this pathogen remains the main cause of worldwide foodborne diseases. There are many foods involved with these foodborne outbreaks; however eggs and eggs products have been identified as a frequent vehicle of *S. Enteritidis*. In Brazil, as well as in the State of RS, *Salmonella* spp. is the major cause of foodborne diseases, and HM is the food vehicle most involved.

Thus, to produce and consequently to consume a safe HM, firstly it is necessary to analyze the egg quality, checking if the eggs are clean and free of visible dirt or feathers and if the shells are not broken or cracked. It is also important to verify if the industrial egg producer present adequate food safety management systems implemented. Eggs produced without adequate sanitary controls may present higher risks to be contaminated.

After the HM was prepared, it must be maintained under refrigeration (below 7°C) to avoid the SE86 growth. According to our results, HM stored at 10°C, during 18 h would not allow SE86 growth, then to maintain the HM at this temperature, it ought to be consumed as soon as possible. The State of São Paulo Health Surveillance recommends for mayonnaise and mayonnaise mixed with other foods: up to 4°C for 48 h CVS-5/2013 (São Paulo, 2013), it is a very restrictive condition. While The Brazilian Health Surveillance RDC n. 216 (Brazil, 2004) recommends storage at $\leq 4^\circ\text{C}$ for maximum 5 days for any type of food. However, it is important to highlight if the eggs used to prepare HM are highly contaminated the control of temperature could not be an adequate control measure. Based on this, only cooked or pasteurized eggs are recommended to preparation of safe HM.

Another major concern is the cross contamination, for example, the contact between the shell and the contents of the egg should be minimized when

breaking eggs, the surfaces which have been in contact with raw eggs, as well as the utensils used for their preparation, should be thoroughly washed, sanitized and dried before being used again to avoid cross contamination. Besides, raw products (especially poultry meat) can be sources of *Salmonella* spp., emphasizing that raw and cooked food should be separated.

Therefore, in this study, a growth model of SE86 on HM was developed in order to support the decision making to avoid the *Salmonella* spp. outbreak occurrence. Beyond that, the growth parameters found in this study may be used in Quantitative Risk Assessment to calculate the risk of growth of *Salmonella* Enteritidis on HM and the salmonellosis.

Acknowledgements

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAUFRGS (Fundação de Apoio da Universidade do Rio Grande do Sul) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

4. References

Albrecht, C.F. (2010) Além da carne assada sobre brasas: os elementos da experiência de consumo do churrasco (dissertation) UFRGS, Porto Alegre, Brazil

Anonymous (2002). ISO 6579-2002(E) – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization. Switzerland.

Anonymous (2010). Ministério da Saúde, Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica, Alimentar e Sexual. Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Ministério da Saúde, Brasília, Brazil.

Anonymous (2013). Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos, Brasília, Brazil.

Asseva, G.; Petrov, P.; Ivanova, K.; Kantardjiev, T. (2012). Systemic and extraintestinal forms of human infection due to non-typhoid *salmonellae* in Bulgaria, 2005–2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 31, 3217-3221.

Baranyi, J.; Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol.* 23, 277-94

Brazil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 216, September, 15th 2004. Dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p. 25.

Cogan, T.A.; Domingue, G.; Lappin-Scott, H.M.; Benson, C.E.; Woodward, M.J.; Humphrey, T.J. (2001). Growth of *Salmonella* Enteritidis in artificially contaminated eggs: the effects of inoculum size and suspending media. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 131–141

D'Aoust, J.Y. (1991). Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, 13, 207-216

Di Pinto, A.; Novello, L.; Montemurro, F.; Bonerba, E.; Tantillo, G. (2010). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods from supermarkets in Southern Italy. *New Microbiol.*, 33, 249-252.

Fica, A.; Acosta, G.; Dabanch, J.; Perret C.; Torres, M.; López, J.; Jofré, L.; Weitzel, T. (2012). Salmonellosis outbreaks and the size and role of the Chilean State. *Rev Chilena Infectol.*, 29, 207-214.

Gantois, I.; Ducatelle, R.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Gast, R.; Humphrey, T.J.; Van Immerseel, F. (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol*, 33, 718–738

Geimba, M.P.; Tondo, E.C.; Oliveira, F.A.; Cardoso, M.I. (2004). Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. *Journal of Food Protection*, 67, 1229-1233.

Geimba, M.P.; Tondo, E.C.; Brandelli, A. (2005). Antimicrobial Resistance in *Salmonella* Enteritidis Isolated from Foods Involved in Human Foodborne Outbreaks Occurred in the South of Brazil, 1999 to 2000. *Journal of Food Safety*, 25, 3, 173-182.

Guerra, C.B.; Miguel, D.P. (2010). Positive *staphylococcus* coagulase and fecal coliforms in cold salads added to mayonnaise sauce. *Food Research International*, 1, 11-15

Gumudavelli, V.; Subbiah, J.; Thippareddi, H.; Velugoti, P.R.; Froning, G.; (2007). Dynamic Predictive Model for Growth of *Salmonella* Enteritidis in Egg Yolk. *Journal of Food Science*, 72, 254-262

Gurtler, J.B.; Conner, D.E. (2009). Survival and Growth of *Salmonella* Enteritidis in Liquid Egg Products Varying by Temperature, Product Composition, and Carbon Dioxide Concentration. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 561-567

Humphrey, T.J. (2004). *Salmonella*, stress responses and food safety. *Science and Society*, 2, 504-509.

Lanciotti, R.; Sinigaglia, M.; Gardini, F.; Vannini, L.; Guerzoni, M.E. (2001). Growth/no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration. *Food Microbiology*, 18, 659-668.

Lianou, A.; Koutsoumanis, K.P. (2011). Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. *Food Microbiology*, 28, 828-837

Machado, T.R.M.; Malheiros, P.S.; Brandelli, A.; Tondo, E.C. (2010). Avaliação da Resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 69, 475-481.

Malheiros, P.S.; Brandelli, A.; Tondo, E.C. (2008). Acid and thermal resistance of a *Salmonella* Enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks. Journal of Food Safety, 29, 302-317.

Malheiros, P.S.; De Paula, C.M.D.; Tondo, E.C. (2007). Cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com linhagens de outros sorovares. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 27, 751-755

Matches, J.R.; Liston, J. (1968). Low temperature growth of *Salmonella*. Journal of Food Science, 33, 641-645

Matheson, N.; Kingsley, R.A.; Sturgess, K.; Aliyu, S.H.; Wain, J.; Dougan, G.; Cooke, F.J. (2010). Ten years experience of *Salmonella* infections in Cambridge, UK. J Infect., 60, 21-25.

McMeekin, T.; Bowman, J.; McQuestin, O.; Mellefont, L.; Ross, T.; Tamplin, M. (2008). The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. International Journal of Food Microbiology, 128, 2-9.

Norton, S.; Huhtinen, E.; Conaty, S.; Hope, K.; Campbell, B.; Tegel, M.; Boyd, R.; Cullen, B. (2012). A large point-source outbreak of *Salmonella* Typhimurium linked to chicken, pork and salad rolls from a Vietnamese bakery in Sydney. Western Pac Surveill Response J., 21, 16-23.

Oh, D.H.; Ding, T.; Jin, Y.G. (2012). A New Secondary Model Developed for the Growth Rate of *Escherichia coli* O157:H7 in Broth. Indian J Microbiol, 52, 99-101

Oliveira, F.A.; Frazzon A.P.; Brandelli A.; Tondo E.C. (2007). Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella* Enteritidis involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. J. Infect. Dev. Countries, 1, 170-176.

Oliveira, F.A.; Geimba M.P.; Brandelli A.; Silva W.P.; Pasquali G.; Tondo E.C. (2009). Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. Food Control, 20, 606-610.

Oliveira, F.A.; Pasqualotto, A.P.; Padilha, W.; Tondo, E.C. (2010). Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from human samples. Food Research International, 1, 2-5.

Oscar, T.P. (2011). Development and Validation of a Predictive Microbiology Model for Survival and Growth of *Salmonella* on Chicken Stored at 4 to 12°C. Journal of Food Protection, 74, 279-284

Papamichalis, P.; Argyraki, K.; Papamichalis, M.; Loukopoulos, A.; Daleskos, G.N.; Rigopoulou, E.I. (2011). Case Report *Salmonella* Enteritidis Infection Complicated by Acute Myocarditis: A Case Report and Review of the Literature. Research Cardiology Research and Practice, Article ID 574230, 1-6.

Paula, C.M.D.; Geimba, M.P.; Amaral, P.H.; Tondo, E.C. (2011). Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human sal-

monellosis outbreaks in Southern Brazil from 2003 to 2006. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3, 233-240.

Perez, K.J.; Martins, F.S.; Cara, D.C.; Nicoli, J.R.; Tondo, E.C. (2012). Evaluation of intestinal invasion in germ free mice challenge with acid-adapted and non acid-adapted *Salmonella* Enteritidis SE86 and *Salmonella* Typhimurium ST99. *Journal of Food Safety*, 32, 108–114.

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

Ritter, A.C.; Bacciu, D.; Santi, L.; Silva, W.O.B.; Vainstein, M.H.; Rubino, S.; Uzzau, S.; Tondo, E.C. (2012). Investigation of *rpoS* and *dps* genes in sodium hypochlorite resistance of *Salmonella* Enteritidis SE86 isolated from foodborne illness outbreaks in Southern Brazil. *Journal of Food Protection*, 75, 437-42.

Sakha, M.Z.; Fujikawa, H. (2012). Growth characteristics of *Salmonella* Enteritidis in pasteurized and unpasteurized liquid egg products. *Biocontrol Science*, 17, 183-190

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

São Paulo (State). Secretaria da Saúde. Portaria CVS n. 05, April, 19th 2013. Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação, e o roteiro de inspeção, anexo. *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, São Paulo, p. 32.

Scallan, E.; Hoekstra, R.M.; Angulo, F.J.; Tauxe, R.V.; Widdowson, M.; Roy, S.L.; Jones, J.L.; Griffi, P.M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*, 17, 7–15.

Singh, A.; Korasapati, N.R.; Juneja, V.K.; Subbiah, J.; Froning, G.; Thipareddi, H. (2011). Dynamic Predictive Model for the Growth of *Salmonella* spp. in Liquid Whole Egg. *Journal of Food Science*, 76, 225-232

Stein-Zamir, C.; Tallen-Gozani, E.; Abramson, N.; Shoob, H.; Yishai, R.; Agmon, V.; Reisfeld, A.; Valinsky, L.; Marva, E. (2009). *Salmonella enterica* outbreak in a banqueting hall in Jerusalem: the unseen hand of the epidemiological triangle. *Isr Med Assoc J.*, 11, 94-97.

Tondo, E.C.; Machado, T.R.M.; Malheiros, P.S.; Padrão, D.K.; Carvalho, A.L.; Brandelli, A. (2010). Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. *Brazilian Journal of Microbiology*, 4, 10-20.

Tondo, E.C.; Ritter, A.C. *Salmonella* and Salmonellosis in Southern Brazil: a Review of the Last Decade (2012) Chapter of *Salmonella: Classification, Genetics and Disease Outbreaks*

Wang, H.Y.; Wen, C.F.; Chiu, Y.H.; Lee, I.N.; Kao, H.Y. (2013). *Leuconostoc Mesenteroides* Growth in Food Products: Prediction and Sensitivity Analysis by Adaptive-Network-Based Fuzzy Inference Systems. *PLoS ONE*, 8, 1-16.

Zhang, G.; Brown, E.W.; Hammack, T.S. (2013). Comparison of different preenrichment broths, egg: preenrichment broth ratios, and surface disinfection for the detection of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Enteritidis in shell eggs. *Poult Sci.*, 92, 3010-3016.

Table 1: Growth kinetic parameters of *Salmonella* in HM and in ComBase Predictive Models at different temperatures. At 7°C, multiplication of SE86 on HM was not observed.

Growth Parameters	Model	Temperature (°C)						
		7	10	15	20	25	30	37
μ_{\max}		-	0.028	0.103	0.225	0.441	0.668	0.988
λ	HM	-	17,816	8.18	3.67	2.15	1.64	1.23
FP		-	6.22	8.90	9.27	9.21	9.46	9.28
μ_{\max}		0.016	0.034	0.104	0.252	0.484	0.74	0.913
λ	Com Base	205.624	96.7	31.63	13.05	6.79	4.44	3.60
FP		8.52	8.52	8.52	8.52	8.52	8.52	8.52

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

Figure 1: Growth of SE86 on HM stored at 10°C (symbolized by ■), 15°C (symbolized by ◆), 20°C (symbolized by –), 25°C (symbolized by ●), 30°C (symbolized by ×) and 37°C (symbolized by ▲), fitting data to DMFit add-in version 2.1. Each symbol represents a mean of triplicate results.

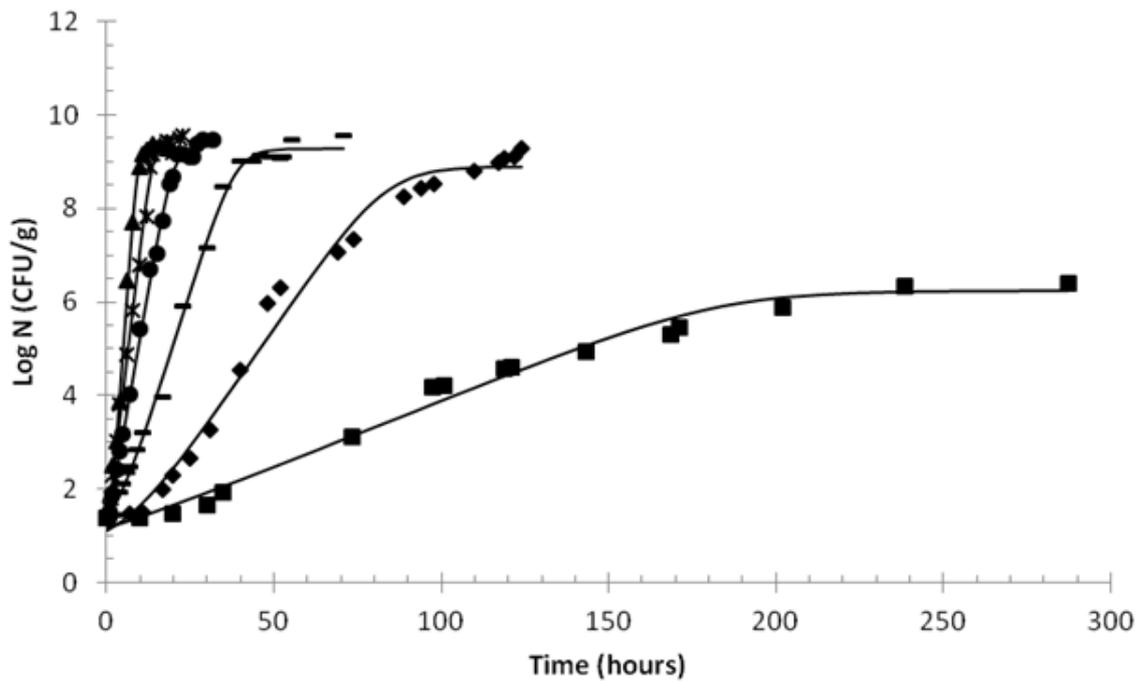


Table 2: Secondary model represented by square root equation, showing the relationship between growth rate and temperature of *Salmonella* on HM and calculated from ComBase.

	Secondary Model	R ²	RMSE
HM	$\sqrt{\mu} = 0.0313(T - 4.48)$	0.99	0.016
ComBase	$\sqrt{\mu} = 0.03(T - 3.17)$	0.98	0.037

μ = the growth rate (log CFU/g/h); T = temperature (°C).

VITA

I. Identificação

Nome: Susana de Oliveira Elias

Endereço: Avenida Bento Gonçalves, 9500 – Campus do Vale – Prédio 43212
– CEP 91501-970 - Porto Alegre/RS/Brasil

E-mail: susanaelias@gmail.com

Tel.: 51 33086677

II. Formação profissional

2012 – atual: Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela UFRGS

2007 – 2011: Graduação em Biomedicina pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

III. Formação complementar

2011: Estágio Obrigatório Supervisionado no LACEN/RS (Laboratório Central de Estado). Carga Horária: 600 horas.

2010 – 2011: Estágio no Centro de Biotecnologia da UFRGS, sob orientação do Professor Alexandre Macedo. Carga Horária: 1270 horas.

2009: Estágio em Microbiologia na UFRGS, sob orientação da Professora Gertrudes Corção. Carga Horária: 200 horas.

2008: Estágio nos Laboratórios Geral e de Absorção Atômica na UFRGS, sob orientação da Professora Maria Tereza Rodrigues. Carga Horária: 144 horas.

2007 – 2008: Estágio no Centro de Biotecnologia da UFRGS, sob orientação do Professor Arnaldo Zaha. Carga Horária: 380 Horas

IV. Outros conhecimentos

Domínio da Língua Inglesa e Conhecimentos em Informática (Pacote *Office*).