

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

LARISSA PIRES FERIGOLO

**SOBREVIVÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* EM CARNE BOVINA TRATADA
TERMICAMENTE EM SISTEMA *SOUS VIDE***

Porto Alegre
Setembro/2019

LARISSA PIRES FERIGOLO

**SOBREVIVÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* EM CARNE BOVINA TRATADA
TERMICAMENTE EM SISTEMA *SOUS VIDE***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador(a): Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Coorientador(a): Prof. Dra. Mercedes Passos Geimba

Porto Alegre
Setembro/2019

Dedico este trabalho a minha família em especial ao meu noivo que esteve ao meu lado em todas as etapas dessa conquista, além de ter sido o meu maior incentivador. As mudanças e o crescimento que tive em minha vida me permitiram ver que sou mais forte do que eu pensava e muito mais feliz do que imaginei um dia ser, ao seu lado. Obrigada, amor, pela paciência e companheirismo e amor a mim dedicados. TE AMO!

AGRADECIMENTOS

A todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento do projeto (Susana de Oliveira Elias; Danielle Carmo da Silva; Stefani Machado Lopes; Mercedes Passos Geimba; Eduardo Cesar Tondo).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ou Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa.

SOBREVIVÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* EM CARNE BOVINA TRATADA TERMICAMENTE EM SISTEMA *SOUS VIDE*

Autor: Larissa Pires Ferigolo

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Coorientador(a): Prof. Dra. Mercedes Passos Geimba

RESUMO

A Carne bovina é muito preparada e consumida em todo o mundo, sendo uma das matérias-primas mais utilizadas na gastronomia. Paralelamente a isso, ela tem sido envolvida em surtos alimentares. O sistema *Sous vide* é um tratamento térmico bastante prático e seguro. Nele, temperaturas de 50 a 95 °C são aplicadas, por longos períodos, em alimentos embalados a vácuo, seguido de resfriamento e estocagem. O objetivo desse trabalho foi avaliar a sobrevivência da *Escherichia coli* em carne bovina tratada em sistema *Sous vide*, utilizando a temperatura de 54° C, por 24h. Para tanto, um “pool” de *E. coli* foi inoculado (7 log UFC/g) em peças de 100g de *fillet mignon*, as quais foram submetidos ao tratamento térmico. Contagens microbianas foram realizadas em triplicata, nos tempos 0h, 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 24 de cocção e então modeladas no *software GlnaFIT*, utilizando o modelo linear de Geeraerd *tail*. Também foram realizadas contagens totais de mesófilos e identificação dos microrganismos sobreviventes por MALDI-TOF. Os resultados indicaram que, em 9 horas de cocção, 5,9 log UFC/g de *E. coli* foram completamente inativados. Os dados experimentais se ajustaram bem ao modelo de inativação utilizado, demonstrando R² 0,95 e RMSE 0,56. A microbiota natural das peças de filé mignon, no início do processo, foi diversificada e entre os principais gêneros sobreviventes ao tratamento térmico foram identificados *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Pseudomonas stutzeri* e *Bacillus licheniformis*. As contagens iniciais de mesófilos totais foram de cerca de 6,13 +/- 0,84 log UFC/g, sendo reduzidas para 2,82 +/- 0,60 log UFC/g, após 24 horas. Os resultados deste estudo demonstram que o sistema *Sous vide* foi capaz de inativar 5,9 log UFC/g de *E. coli* e reduzir significativamente a população de mesófilos totais, utilizando temperaturas de 54°C, após 9 horas de tratamento térmico.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (64 p.) outubro, 2019.

SURVIVAL OF *ESCHERICHIA COLI* ON BOVINE MEAT THERMICALLY TREATED BY SOUS VIDE SYSTEM

Author: Larissa Pires Ferigolo

Advisor: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Co-Advisor (a): Prof. Dra. Mercedes Passos Geimba

ABSTRACT

Beef is very consumed worldwide and is one of the most used raw materials in gastronomy. However, at the same time it has been involved in foodborne outbreaks. The *Sous vide* system is a practical and safe heat treatment, in which vacuum packed foods are treated using temperatures from 50 to 95° C for long periods. After that, foods are cooled and storage. The objective of this study was to evaluate the survival of *Escherichia coli* on beef treated by *Sous vide* system, using 54° C for 24 hours. For this purpose, an *E. coli* pool was inoculated (7 log CFU/g) on 100g tenderloin beef pieces, which were submitted to the referred *Sous vide* thermal processing. Microbial counts were carried out in triplicate at the following cooking times: 0h, 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 24 hours. After that, results were modeled by the GinaFit software using the Geeraerd tail linear model. Total mesophilic counts and identification of survivors by MALDI-TOF were also performed. Results demonstrated that at 9 hours of cooking 5.9 log CF / g of *E. coli* were completely inactivated. The experimental data fit well with the inactivation model, showing R² 0.95 and RMSE 0.56. Initial mesophilic counts were about 6.13 ± 0.84 log CFU / g and were reduced to 2.82 ± 0.60 log CFU / g after 24 hours. The natural microbiota of tenderloin beef pieces at the beginning of the process was diversified and the main survivor genera, after heat treatment, were *Staphylococcus wagneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Pseudomonas stutzeri* and *Bacillus licheniformis*. Results of this study demonstrate that the *Sous vide* system was able to inactivate 5.9 log CFU/g of *E. coli* and significantly reduce the total mesophilic microorganisms at 54 ° C, for 9 hours of thermal process.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Alimentação fora do lar.....	17
3.2 O mercado brasileiro de carnes e de serviços de alimentação.....	18
3.3 Alta Gastronomia.....	20
3.4 Sistema <i>Sou vide</i>	21
3.5 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA).....	25
3.6 <i>Escherichia coli</i>	28
3.7 Legislação – Controle de tempo versus temperatura.....	29
3.8 Espectrometria de massa por ionização por dessorção assistida por matriz de tempo de laser (MALDI – TOF MS).....	30
3.9 Microbiologia Preditiva.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Obtenção e preparo das amostras de filé mignon.....	35
4.2 Análise de parâmetros intrínsecos.....	35
4.3 Cepas bacterianas e preparação de inóculo.....	35
4.4 Aplicação processo <i>Sous vide</i> – Procedimento.....	36
4.5 Análises microbiológicas.....	37
4.6 Análise da microbiota da carne por espectrometria de massa MALDI – TOF MS.....	38
4.7 Teste de inativação completa de <i>Escherichia coli</i>	39
4.8 Modelagem matemática.....	40
4.9 Análise estatística.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Fatores intrínsecos e carga microbiana inicial das peças de filé mignon.....	41
5.2 Inativação térmica de <i>Escherichia coli</i>	42
5.3 Análise da microbiota natural das amostras de carne bovina por espectrometria de massa MALDI – TOF MS.....	47
6. CONCLUSÃO	49
7. REFERÊNCIAS	50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Contagem de mesófilos totais em peças de carne bovina (filé mignon, a vácuo, imerso em termocirculador de água com temperature de 54° C.....42
- Tabela 2:** Inativação térmica de *Escherichia coli* em peças de carne bovina (filé mignon), a vácuo, imersas em termocirculador com água a 54° C.....43
- Tabela 3:** Microbiota encontrada nos pedaços crus de filé mignon e filé mignon após 24 horas de tratamento térmico *Sous vide*.....47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Pedacos de filé mignon sendo submetidos ao processo de retirada do ar, em sacos plásticos, pela seladora a vácuo.....37
- Figura 2:** Pedacos de filé mignon sendo submetidos ao processo térmico *Sous vide*, com termopares inseridos no centro dos mesmos e na água do termocirculador.....38
- Figura 3:** Aspecto visual da carne processada a 54° C por 9 horas em um termocirculador de água com temperatura controlada.....46
- Figura 4:** Curva de inativação de *Escherichia coli*. a 54° C, obtida pelo modelo de Geeraerd tail. ●: pontos experimentais-:curva estimada pelo modelo de inativação.....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIA	Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação
	ABERC - Associação Brasileira das empresas de refeições coletivas
ABF	Associação brasileira de franchising
ABIEC	Associação Brasileira das indústrias exportadores de carne
ABRASEL	Associação Brasileira de Bares e Restaurantes
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	<i>Brain Hearth Infusion</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CFIA	<i>Canadian Food Inspection Agency</i>
CHD	<i>Chicago Food Services Analysis and Data Company</i>
D	Tempo de redução decimal necessário para reduzir 90% dos micro-organismos
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	<i>E. coli</i> entero-hemorrágica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
EAggEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente adesiva
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMSF	<i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i>
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
mbar	Medir a pressão atmosférica em milésimos de bar
MUG	4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMSE	Erro quadrático médio
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
VRBA	<i>Violet Red Bile Agar</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. INTRODUÇÃO

No início do século XX, a gastronomia deixou de ser vista apenas como forma de alimentação, convertendo-se em um fenômeno que acarretou diversas mudanças sociais e culturais. O estilo de vida moderno passou a ter como alternativa diversos alimentos congelados, pré-cozidos, de rápida preparação e sensorialmente agradáveis. Hoje em dia, a gastronomia vem conquistando cada vez mais espaço na vida de muitos consumidores, os quais exigem saborear alimentos mais elaborados e com características diferenciadas. Dessa forma, inúmeros restaurantes populares e sofisticados passaram a aplicar técnicas de preparo de alimentos que evidenciam a exaltação sensorial.

A carne bovina é amplamente preparada por diversas técnicas gastronômicas, sendo algumas vezes envolvida em surtos alimentares, em virtude de que, carnes *in natura*, de qualquer espécie animal (bovina, suína, aves, carnes de caça e exóticas) podem ser veículos de diversos patógenos.

Devido às suas características intrínsecas e modos de produção, produtos cárneos, podem ser facilmente contaminados, principalmente se não forem utilizadas práticas adequadas de higiene e manipulação. A bactéria *E. coli* é a principal espécie no grupo dos coliformes termotolerantes, considerada como um indicador fecal e associada à possível presença de patógenos entéricos. A dinâmica da preparação de refeições em restaurantes exige que os processos sejam cada vez mais práticos e seguros, sendo o *Sous vide* uma ótima alternativa para a preparação de carnes.

O *Sous vide* é um sistema que aplica temperaturas de 50 a 95 °C em alimentos embalados a vácuo, geralmente por períodos prolongados, seguido de resfriamento e estocagem entre 0 e 3 °C, e reaquecido antes do consumo. Esse sistema propicia a manutenção das características sensoriais e nutricionais dos alimentos, aumentando sua vida útil e facilitando a dinâmica dentro dos restaurantes. Na literatura, há relatos que carnes em geral podem ser preparadas e cozidas pelo *Sous Vide* em termocirculador com água a 54,4° C por 24 horas.

No entanto, diferentes legislações nacionais e internacionais exigem que alimentos, incluindo carnes, devem ser cozidos em temperaturas mais elevadas. Por exemplo, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e o Serviço de Inspeção e Segurança de Alimentos dos Estados Unidos (FSIS) a

temperatura interna mínima de pedaços de carne bovina processados termicamente deve ser de 62,8° C (145° F), deixando o alimento em repouso por pelo menos 3 minutos, antes de servi-lo. A Agência Canadense de Inspeção de Alimentos – CFIA, orienta que a temperatura interna mínima da carne bovina deve ser de 63° C (145° F) para carnes mal passadas, pelo menos 71° C (160° F) para carnes ao ponto e pelo menos 77° C (170° F) para carnes bem passadas. As normas europeias preconizam tratamentos térmicos que sejam capazes de reduzir 6 log (6D) de *Listeria monocytogenes*.

No Brasil, a Resolução – RDC N° 216, de 15 de setembro de 2004, que dispõem sobre o regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação, preconiza que o tratamento térmico deve garantir que todas as partes do alimento atinjam a temperatura de no mínimo 70° C e caso temperaturas inferiores sejam utilizadas, a combinação de tempo e temperatura deve ser suficiente para assegurar a qualidade higiênico-sanitária do alimento. Duas outras legislações regionais brasileiras determinam que os alimentos devem ser completamente tratados termicamente a, no mínimo, 70° C e 74° C, respectivamente, ou por outras combinações de tempo e temperatura seguras. Todos esses parâmetros legais de temperaturas são superiores a algumas temperaturas recomendadas para a preparação de carnes pelo *Sous vide*.

Com base nessas informações, é de grande importância avaliar a eficácia do tratamento térmico *Sous vide* na inativação de microrganismos presentes em alimentos, principalmente aqueles envolvidos em surtos alimentares, como as carnes bovinas.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Avaliar a sobrevivência de *Escherichia coli* em carne bovina tratada termicamente por sistema *Sous vide* a uma temperatura de 54° C, por 24 horas.

1.2 Objetivos Específicos

- 1.2.1 Avaliar as variações de tempo e temperatura em filé mignon bovino, durante processamento *Sous vide*;
- 1.2.2 Avaliar o comportamento de *Escherichia coli* por meio de modelos matemáticos de inativação térmica.
- 1.2.3 Avaliar sobreviventes da microbiota da carne bovina bovina, ao longo do processamento em *Sous vide*, através de MALDI-TOF.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Alimentação Fora do Lar

Atualmente, os consumidores tendem gradativamente ao consumo de alimentos fora do lar. Aspectos como a progressiva urbanização, aumento da renda e as mudanças geradas nos hábitos de consumo, aumentam a demanda por esse tipo de alimentação (WHO, 2015). A carne é um dos produtos mais consumidos no mundo, sendo que no Brasil no ano de 2017 foram produzidos 10 milhões de toneladas, seguindo padrões rigorosos de qualidade. Na última década houve um crescimento de 135% no valor das exportações (ABIEC, 2018).

Os produtos cárneos são suscetíveis à contaminação microbiana nos processos de aquisição, transporte, processamento, armazenamento e vendas. As fontes de contaminação são inúmeras, podendo estar nos utensílios utilizados na manipulação, no sistema de ventilação do ambiente, estrutura física inadequadas, bem como higienização inadequada dos manipuladores (Silva, 2010).

Os consumidores estão cada vez mais exigentes quanto a qualidade e segurança nas refeições que os estabelecimentos de alimentação oferecem. Produtos de origem animal possuem características deterioráveis superiores a outras mercadorias. No Brasil, do total das despesas com a alimentação, aproximadamente 31 % são destinadas ao consumo fora do lar, sendo os maiores dispêndios com as refeições de almoço e de jantar (62,7 %) seguido de bebidas (12,5 %) (IBGE, 2009). O mesmo comportamento é observado em outros países, como na China e nos Estados Unidos da América (EUA), onde o crescimento nas despesas com o consumo de alimentos fora do lar apresenta um papel importante (Liu et al., 2015; USDA-ERS, 2016).

O aumento da procura por serviços de alimentação tem sido cada vez mais evidenciado. No Brasil, os restaurantes correspondem a 23% de um total de 32,4 % da indústria de alimentos (ABIA, 2016; ABRASEL, 2012). Dentre as opções de restaurantes, estão os restaurantes de alto padrão, também conhecidos como de alta gastronomia, os quais podem ser definidos como locais onde são preparadas refeições de qualidade, executadas por *chefs*, objetivando oferecer uma experiência única aos clientes, não só por meio do sabor da preparação, mas também pelo atendimento e pelo ambiente (Zanoni, 2012).

Nos EUA, 1,4 % dos restaurantes são de alta gastronomia, com cerca de

5000 estabelecimentos (CHD, 2016). No Brasil, tendências de sensorialidade e prazer no serviço de alimentação sugerem que um dos principais aspectos a ser valorizado no ano de 2020 será a sofisticação. No cardápio, a tendência são receitas exclusivas, menus degustação e o resgate das tradições regionais no desenvolvimento de novas receitas. Ademais, a tendência nos sistemas de gestão exalta a valorização dos *chefs* de cozinha. Essas tendências se relacionam estritamente com o conceito da alta gastronomia e, portanto, são indicativas de um provável crescimento do setor no país (Ital, 2010).

2.2 O mercado brasileiro de carnes e de serviços de alimentação

O mercado brasileiro de alimentos é um dos mais expressivos para economia do país. Este segmento engloba bares, doçarias, padarias, restaurantes, lojas de conveniência, mercados e empórios (ABF, 2018). Estabelecimentos que preparam e distribuem alimentos prontos para consumo direto ou indireto são serviços de alimentação (Oliveira & Silva, 2016; Moraes, 2016).

De acordo com a estimativa 2018 da Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas, a demanda deste setor no mercado brasileiro foi crescente nos últimos 8 anos, com 9,4 milhões refeições/dia em 2010. Em 2014, a estimativa atingiu seu ápice, chegando a 12,2 milhões, com queda nos 2 anos seguintes para 11,7 milhões e 11 milhões sucessivamente (ABERC, 2018).

Em 2017, as estimativas do setor no mercado voltaram a crescer para 12 milhões de refeições/dia, esse número, que movimentou 19 bilhões de reais por ano, gerou 210 mil empregos diretos consumindo um volume de 7 mil toneladas de alimentos. Atualmente a estimativa está em 13 milhões refeições/dia, tendo o faturamento do setor aumentado de 10,8 bilhões de reais (2010) para 19,3 bilhões (*Estimativa 2018). Baseado nesse número pode-se mensurar que os serviços de alimentação coletiva representaram em 2018, 63,5% do número de refeições servidas (ABERC, 2018). Esses números representam para os governos uma receita de 2,5 bilhões de reais anuais em impostos e contribuições.

Os produtos mais utilizados e manipulados em serviços de alimentação são os alimentos perecíveis de origem animal que causam um maior impacto econômico nas refeições, como a carne bovina, justificando os cuidados na aquisição e processamento dos mesmos (Moraes, 2016). Esses produtos, devido as suas

características, podem ser facilmente contaminados e deteriorados por diferentes microrganismos, principalmente se não houver práticas de higiene e de manipulação adequadas, processamento adequado e/ou cuidados de conservação apropriados (Mead et al., 1999).

De acordo com a *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), o aumento das tendências de produção e consumo em países em desenvolvimento e da estabilidade consolidada do consumo em países desenvolvidos é o que caracteriza a perspectiva global da carne. Ainda assim, padrões comerciais já estabelecidos para produtos à base de carne foram afetados, devido aos surtos de doenças animais, nos últimos anos. Esses fatores levaram a um aumento da participação de mercado dos países exportadores isentos de doenças, bem como perturbações de curto prazo à oferta e à demanda em grandes países de comércio (OECD-FAO, 2017).

O Brasil conta com 221,81 milhões de cabeças de gado, distribuídos em 164,96 milhões de hectares, 39,2 milhões de cabeças abatidas por ano, ficando atrás somente da Índia que possui 303 milhões de cabeças de gado. Assim torna-se o segundo maior rebanho bovino do mundo, possuindo 22,6% do total de animais e é o maior exportador de carne bovina, com 1,53 toneladas de produto exportado no ano de 2017 (MAPA, 2018; ABIEC, 2018). Mundialmente 60,48 milhões de toneladas de carne bovina são produzidas, sendo os Estados Unidos o líder de produção, com o equivalente a 11,6 milhões de toneladas/ano. O Brasil vem em segundo lugar, com 9,28 milhões de toneladas (Formigoni, 2017a).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2010), o Brasil é um país onde a bovinocultura gera mais de 7,5 milhões de empregos e possui um faturamento superior a R\$ 133 bilhões/ ano. Segundo os dados apresentados pela ABIA (2016), do total da carne produzida pelo Brasil, em torno de 80% são destinados ao mercado interno e 20% para exportações. Esses números representam um faturamento líquido de 26,8% do agronegócio brasileiro.

O consumo de carne bovina da população brasileira está entre os cinco maiores do mundo com 35,8Kg/ ano, estando atrás do Uruguai, Argentina, Hong Kong e Estados Unidos. Assim, a legislação brasileira exerce a fiscalização do produto, desde a criação e, principalmente, nas etapas de abate e posterior beneficiamento com o intuito de melhorar a qualidade e reduzir e/ou sanar as doenças que reduzem a

produção (Formigoni, 2017b).

Segundo Huffman (2002) tão importante quanto a carne crua bovina ser manuseada com segurança, as etapas como o abate do gado e o subsequente processamento de produtos de carne crua bovina são de extrema importância para conferir segurança para o público consumidor. Contudo, alguns pesquisadores relatam que patógenos bacterianos podem sobreviver aos melhores esforços da indústria, de consumidores e do governo para eliminá-los, podendo causar DTA aos consumidores desses produtos sem tratamento térmico adequado antes do consumo (Pinheiro, Sartori, & Ribeiro, 2006; Gonzales-Barrón, Piza, Xavier, Costa, & Cadavez, 2014; Kumar, Rao, Haribabu, & Manjunath, 2014; Mesquita, Valente, Zimmermann, Fries, & Terra, 2014; Chopyk et al., 2016; Yang, Wang, He, & Tran, 2017; Ba et al., 2018).

2.3 Alta Gastronomia

No início do século XIX, na França, a gastronomia deixou de ter como objetivo satisfazer a necessidade de alimentação da população para proporcionar experiências únicas aos apreciadores sendo vista como um fenômeno social, pois, ela evidencia a valorização das características sensoriais e emocionais dos alimentos e seu entorno (Freixa & Chaves, 2015). Esse fato foi relacionado principalmente às mudanças nas condições sociais e culturais, a origem de restaurantes como locais específicos para a produção e o aumento do consumo por alimentos mais elaborados, e a criação de instituições que legitimaram a atuação dos profissionais na área da gastronomia como grandes *Chefs* (Ferguson, 1998).

A ascensão nos aspectos que envolvem a gastronomia mundialmente, como a formação de profissionais em escolas renomadas, a propagação de restaurantes comandados por *chefs* estrelados, e a vasta reprodução de conteúdo, tanto em mídias sociais, quanto televisivas, vem sendo responsável pelo aumento do turismo e transações comerciais em muitos países (Levine, Chaifetz, & Chapman, 2017).

Assim, a gastronomia está inserida em um contexto altamente competitivo em que criatividade e inovação são os principais impulsionadores, sendo fatores importantes no sucesso profissional e econômico dos *chefs*. Hoje os renomados *chefs* dominam as técnicas culinárias, são criativos, ágeis, perfeccionistas e frequentemente elaboram pratos que não foram executados anteriormente (Durand, Rao, Monin, 2007; Ottenbacher, Harrington, 2007; Svejnova, Mazza, Planellas, 2007; Fauchart, Von

Hippel, 2008). A inovação resulta na criação desses novos pratos, que podem incluir o uso de técnicas não convencionais, novos ingredientes, novas utilizações de ingredientes usuais, e a utilização de culinárias regionais e estrangeiras (Aguilera, Blazes, 2013).

Nos últimos anos, com a aplicação de princípios científicos na culinária, foi possível explorar novas áreas na gastronomia, por exemplo, o uso de técnicas que fornecem texturas inéditas (Barham et al., 2010). Técnicas tais como, utilização de baixa temperatura por longos períodos, congelamento com uso de nitrogênio líquido, gelificação, filmes comestíveis e aquecimento com temperatura controlada em banho de água e cozimento a vácuo (*Sous vide*), são, nos dias atuais, amplamente realizadas nas cozinhas de alta gastronomia (Rodgerss, 2007; Cassi, 2011).

O aumento pelo interesse de indivíduos leigos em obter qualidade na culinária, associado a alta tecnologia e aplicação de princípios científicos fez com que a procura por receitas em livros de culinária e aperfeiçoamento em escolas de gastronomia reconhecidas aumentasse. Assim, o acesso a pratos com qualidade profissional vem tornando parte do dia-dia da população mundial.

2.4 Sistema *Sous vide*

A gastronomia brasileira e mundial vem se especializando no processamento de alimentos através de tecnologia, baseado nisso, o mercado hoteleiro e gastronômico brasileiro investe em técnicas, como o *Sous vide*. O termo francês criado em 1975 (Nyati, 2000), quer dizer “sob vácuo”, e refere-se a um método de cocção de alimentos em temperaturas de 50 a 95 °C por longos períodos, a vácuo, dentro de sacolas plásticas, seguido de resfriamento e estocagem, entre 0 e 3 °C, sendo reaquecido para consumo (Shellekens & Martens, 1992; Baldwin, 2012; Moraes, 2016; Karyotis et al., 2017).

Esse método diferencia-se de métodos convencionais, uma vez que permite cozinhar os alimentos utilizando aquecimento precisamente controlado. A embalagem além de manter a umidade ao longo do cozimento, inibe sabores estranhos gerados pela oxidação, previne a perda de sabores por evaporação de compostos voláteis, além de reduzir as contagens de bactérias patogênicas, através da transferência de energia térmica da água para o alimento. Portanto, esse sistema propicia a preservação sensorial e nutricional dos alimentos, aumentando sua vida útil, tornando o

alimento especialmente saboroso e nutritivo (Baldwin, 2012; Moraes, 2016). De acordo com Nyati (2000), Vaudagna et al. (2002) e Wang et al. (2004), dependendo das condições de processamento que são utilizadas, a vida útil de carnes processadas pelo sistema *Sous vide* pode atingir até 7 semanas.

O sistema *Sous vide* é baseado em cinco etapas, sendo elas, recepção (estocagem e pré-processamento), embalagem a vácuo, processamento térmico, estocagem e finalização para consumo. Em comparação aos sistemas convencionais, o controle adequado das condições de preparo em cada etapa do processamento pode assegurar maior qualidade do alimento, aumentando sua vida útil (Baldwin, 2012).

- **Recepção, estocagem e pré-processamento**

Ao receber as matérias-primas perecíveis, todas as condições higiênico-sanitárias do veículo de transporte, integridade da embalagem, bem como a temperatura de transporte devem ser verificadas e controladas minuciosamente. No momento da chegada, devem ser imediatamente estocadas sob refrigeração, com monitoramento constante de temperatura (Betts, 1992; Betts, 1998).

O pré-processamento das matérias-primas deve incluir limpeza, corte, porcionamento e marinação, podendo haver adição de outros ingredientes (Betts, 1992; Schellekens, 1996; Betts, 1998). Nessa etapa as boas práticas de manipulação e a qualidade dos ingredientes adicionados são imprescindíveis para qualidade final do produto.

- **Embalagem a vácuo**

Embalagens a vácuo são utilizadas como bolsas termo-resistentes com o intuito de aumentar a eficiência na transferência de calor, evitando a perda de umidade por evaporação. O sistema torna-se mais seguro devido a pouca disponibilidade de oxigênio dentro das embalagens, que além de minimizar as reações de oxidação durante a estocagem e formação de voláteis indesejáveis, atua também inibindo o crescimento de microrganismos aeróbios (García-Linares et al., 2004; Stea et al., 2006).

Outras vantagens podem ser observadas no uso de embalagens a vácuo, como a melhora do sabor e textura da carne cozida. Este fato ocorre devido à redução do desenvolvimento de produtos de oxidação, preservando a maciez e a suculência da carne (Popova et al., 2009; Xiao et al., 2011). Outro benefício é a redução do risco de

recontaminação durante a estocagem (García-Linares et al., 2004; Stea et al., 2006; Baldwin, 2012).

Segundo Baldwin (2012), para a inibição do crescimento de bactérias aeróbias o vácuo recomendado é de 10 a 15 mbar para alimentos sólidos. Portanto, para que não haja re-contaminação, a integridade da embalagem deve ser verificada antes e após o processamento térmico, bem como apresentar baixa permeabilidade ao oxigênio e ao vapor d'água e garantir resistência térmica e mecânica adequada (Díaz et al., 2010).

- **Processamento térmico**

O processo de cocção do alimento embalado a vácuo deve ser realizado entre 50 e 95° C (Shellekens & Martens, 1992; Baldwin, 2012; Moraes, 2016; Karyotis et al., 2017). O banho-maria é o meio de cocção mais utilizado para o processamento pelo sistema *Sous vide*, conferindo-lhe melhor distribuição de calor, desde que haja garantia da submersão total das embalagens (Rybka-Rodgers, 1999; Baldwin, 2012). Outro meio de cocção que favorece lotes maiores é a utilização de fornos de convecção com injeção de vapor, no entanto nesse meio há dificuldade na uniformização do vapor em baixas temperaturas de cozimento (Sheard & Rodger, 1995). Douglas Baldwin (2008) relata que carnes em geral podem ser preparadas e cozidas pelo *Sous Vide* em termocirculador com água a 54,4° C por 24 horas.

O alimento deve ser resfriado rapidamente após o cozimento para que suas características sensoriais sejam preservadas e garantir que a proliferação microbiana seja minimizada (Baldwin, 2012). Para que essas características sejam controladas é importante que o resfriamento seja de 60 até 10°C em, no máximo, 2 horas (Mcdonald et al., 2000; BRASIL, 2004; SÃO PAULO, 2013), o qual pode ser realizado em um equipamento de resfriamento rápido ou em banho de água gelada (Oliveira & Silva, 2016).

Existe no mercado um resfriador rápido ou *blast chiller*, que é um equipamento que propicia o resfriamento rápido do alimento por meio da convecção de ar frio em alta velocidade. Sua aplicação tende a ser uniforme em todo o lote, sem que haja necessidade de agitação da carne e do constante monitoramento, o que lhe confere uma vantagem sobre o banho de água gelada. Como dito anteriormente, o resfriamento rápido é importante por conferir segurança ao alimento, pois resfriamento

lento corrobora com o crescimento de microrganismos como *Clostridium perfringens* (Juneja et al., 1999).

- **Estocagem**

As condições de tempo e temperatura em todo o processamento térmico do sistema *Sous vide* devem reduzir a níveis seguros a contaminação microbiológica dos alimentos. Portanto, ao estocar os alimentos que foram processados pelo sistema *Sous vide*, principalmente a carne, as temperaturas devem ser de 0 a 3,3° C, para que haja inibição da germinação de esporos termo-resistentes, como os do *Clostridium botulinum* e do *Bacillus cereus* (Hatherway, 1998; Baldwin, 2012).

O controle dessas temperaturas é de grande importância, pois ao longo do processo de estocagem sob refrigeração, pode haver crescimento de microrganismos deteriorantes como, por exemplo, bactérias lácticas (Borch et al., 1996; Korkeala & Bjlrkroth, 1997). Esse grupo de bactérias lácticas anaeróbias facultativas podem acarretar alterações sensoriais do produto, já que elas produzem substâncias com aromas e sabores indesejáveis, por isso o controle do seu crescimento é importante para segurança microbiológica e sensorial do alimento (Narendranath et al., 1997).

- **Finalização para consumo**

Para alimentos que foram submetidos ao sistema *Sous vide* serem consumidos, é necessário que os mesmos sejam reaquecidos, no mínimo, 70° C (BRASIL, 2004). Ao final do processamento pelo sistema *Sous vide* a carne não atinge as condições de sabor e cor que são produtos da reação de Maillard e da degradação térmica e oxidativa de lipídios, quando a carne é cozida a temperaturas mais elevadas (Mottram, 1998).

O aspecto de cor dourada e sabor de tostado são obtidos através de temperaturas em torno de 150° C, mas a reação de Maillard ocorre em temperaturas em torno de 130° C. Assim, visando a melhoria da aparência e do sabor do alimento, o mesmo pode ser submetido a finalizações em altas temperaturas para obtenção de uma crosta externa crocante, saborosa e marrom (Ruíz, 2010; Baldwin, 2012).

Sendo assim, o objetivo do sistema *Sous vide* é potencializar o rendimento e as características sensoriais do alimento processado, minimizando os riscos de contaminação.

2.5 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)

Segundo o Ministério da Saúde, as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), são aquelas causadas pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados. Já se sabe que DTAs são causadoras de infecções causadas por bactérias e suas toxinas, vírus e parasitas, tendo 250 tipos de DTA conhecidos mundialmente. É considerado surto de DTA quando duas ou mais pessoas apresentarem os mesmos sintomas após ingerirem algum alimento ou água em um mesmo lugar (Ministério da Saúde, 2019).

Em todo o mundo, já se sabe que as doenças transmitidas por alimentos (DTA) são grandes causadoras de morbidade e mortalidade. Elas estão relacionadas, em muitos países, à um problema econômico e de saúde pública. Há previsões de que mudanças globais, mudanças climáticas, aumento da pobreza, crescimento da população, a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos e exportação de alimentos possam estar relacionados ao aumento de DTAs pelo mundo (Ministério da Saúde, 2019).

Ao ingerir alimentos contaminados podemos observar alguns sintomas característicos como náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre. Além dos sintomas digestivos, outras manifestações dessas doenças são possíveis, como, afecções extra intestinais, em diferentes órgãos e sistemas como: meninges, rins, fígado, sistema nervoso central, terminações nervosas periféricas e outros. Todos esses sintomas são passíveis de levar a pessoa infectada a óbito, de acordo com a quantidade e com o agente microbiológico envolvido (BRASIL, 2010).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde as primeiras estimativas de doenças transmitidas por alimentos causadas por 31 tipos de agentes (bactérias e suas toxinas, vírus, parasitas) nos mostram que quase uma em cada dez pessoas, ou 600 milhões adoecem todos os anos ao ingerir alimentos contaminados e 420.000 chegam a óbito, sendo que crianças menores de 5 anos de idade correm maiores riscos de contaminação, com 125.000 crianças morrendo ao ano por DTA. Um dos resultados de estimativa da OMS é que mesmo constituindo 9% da população global, quase um terço (30%) das mortes por doenças transmitidas por alimentos ocorre em crianças com menos de 5 anos de idade (WHO, 2015a).

Sintomas como diarreias são frequentes em indivíduos que fizeram a ingestão de carne crua ou mal cozida, ovos, produtos frescos e laticínios contaminados

normalmente por norovírus, *Campylobacter*, *Salmonella* não tifóide e *Escherichia coli* patogênica. Essas doenças diarreicas são responsáveis por adoecer 550 milhões de pessoas e 230.000 mortes ao ano, tendo uma atenção especial à crianças que 220 milhões adoecem e 96.000 chegam a óbito a cada ano (WHO, 2015a).

Nas Américas, estima-se que 77 milhões de indivíduos sofram um episódio de DTA a cada ano, sendo metade delas crianças menores que 5 anos de idade. Esses dados indicam que DTA geram US\$ 700 mil a US\$ 19 milhões em custos anuais de saúde nos países do Caribe e mais de US\$ 77 milhões nos Estados Unidos (Ministério da Saúde, 2019). Outro órgão como o Center for Disease Control and Prevention (CDC), centro de vigilância de doenças dos Estados Unidos, estima que um a cada seis americanos (ou 48 milhões de pessoas) ao ano, fica doente, sendo que 128 mil são hospitalizados e 3 mil chegam a óbito. No entanto, no Brasil de acordo com os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), 700 surtos de DTA são notificados em média, por ano, com 13 mil doentes e 10 óbitos (Ministério da Saúde, 2019).

No Brasil os principais causadores das doenças transmitidas por alimentos são: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, Rotavírus e Norovírus. Cada microrganismo possui um tempo de incubação para que comece a apresentar sinais, no entanto costuma variar de 1-2 dias a no máximo 7 dias para apresentar sintomas após a infecção (Ministério da Saúde, 2019).

Em pesquisa realizada pela Secretaria em Vigilância e Saúde do Brasil, identificou-se que as residências foram os lugares de maior prevalência de surtos alimentares, seguidas de restaurantes e padarias, no período de 2007 a 2017, sendo responsáveis por 7.170 surtos notificados, tendo 126.512 pessoas expostas (Brasil, 2017).

No ano de 2017 os agentes etiológicos causadores dos surtos notificados foram identificados com maior prevalência a *Salmonella* sp., sendo o principal causador de doenças transmitidas por alimentos, seguida por *Staphylococcus aureus* e *E. coli*. Porém, nos últimos anos não foi identificado o agente etiológico em 70,6% dos surtos notificados, no Brasil, conforme dados da Vigilância em Saúde sobre epidemiologia (Brasil, 2017). Nesse mesmo período, os alimentos mais envolvidos em surtos foram os alimentos mistos (8,3%), água (6,2%), leite e derivados (2,8%), ovos e produtos à base de ovos (3,7%), carne bovina *in natura*, processados e miúdos (2,1%), cereais,

farináceos e produtos à base de cereais (1,9%), doces e sobremesas (2,0%), entre outros (6,3%) (Brasil, 2017).

Em um estudo realizado por Wu e colaboradores (2018) sobre surtos de doenças transmitidas por alimentos na China no período de 2003 a 2008, constatou que 20% dos surtos tiveram um período de incubação igual ou superior a 15 horas, sugerindo que muitos poderiam ser de causas virais. No mesmo estudo relataram que 25% dos surtos eram provocados por componentes químicos provocados pelo homem sendo responsáveis por 14% dos casos e 55% de mortes. Outro dado importante identificado pelos pesquisadores foi que 32% dos surtos provinham das residências privadas, 21% de lanchonetes no local de trabalho e 17% de restaurantes. Dos casos em residências 77% foram associadas à mortes.

Em outro estudo realizado por Welker et al. (2010), no período de 2006 a 2007, foram analisadas 223 amostras, sendo 80 produtos cárneos, 45 pratos preparados (pratos prontos para consumo) e 33 amostras de saladas, correspondente a 36%, 20% e 15%, respectivamente, das amostras analisadas, referente a alimentos envolvidos em surtos de DTA no estado do Rio Grande do Sul. As análises relataram que os principais agentes etiológicos identificados nas amostras analisadas foram *Escherichia coli* (41% das contaminações), *Salmonella* spp. (25%) e Estafilococos coagulase positiva (21%). Com relação aos surtos, dos 186 notificados nesse período, 33 deles ocorreram em estabelecimentos comerciais, correspondendo a 15% das notificações.

Os alimentos são um dos principais veículos de transmissão de doenças, por esse motivo devem ser processados adequadamente para que os microrganismos patogênicos nele encontrados sejam inativados. Para que isso ocorra, as etapas do seu processamento como transporte, manipulação e armazenamento devem ser seguras, pois condições inadequadas podem também estar associadas a multiplicação de microrganismos causadores de DTAs. Assim sendo, o controle da qualidade dos alimentos deve ser rígido quando ao processo produtivo, desde a seleção da matéria-prima, transporte, preparo até o consumo, garantindo então, a segurança e inocuidade dos alimentos não causando riscos à saúde dos consumidores.

2.6 *Escherichia coli*

A *E. coli* é a principal espécie no grupo dos coliformes fecais, considerada como um indicador de contaminação fecal e associada a possível presença de patógenos entéricos em carnes. É uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, em forma de bacilos, não formadora de endósporos, encontrada normalmente no intestino dos animais e do homem e faz parte da família Enterobacteriaceae (Forsythe, 2013; Gomes et al., 2016). Ainda que muitas cepas de *E. coli* colonizam o cólon de seres humanos sem causar doenças intestinais e extraintestinais, algumas delas podem causar graves danos à saúde de indivíduos saudáveis e imunodeprimidos. (Gomes et al., 2016; Vásquez-García et al., 2019).

As cepas patogênicas de *E. coli* são divididas, de acordo com os sintomas clínicos, com os mecanismos de patogenicidade, duração da enfermidade e períodos de incubação, sendo reconhecidas como: *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* enteroagregativa (EAggEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* difusamente adesiva (DAEC) (Jay, 2005; Forsythe, 2013; Gómez-Aldapa et al., 2016; Vásquez-García et al., 2019).

Entre os principais sintomas causados pelas DTA devido a *E. coli*, salienta-se diarreia, náusea, dor de cabeça, dores abdominais e vômito com período de incubação de 12 a 72 horas e a duração da doença 2 a 7 dias. A ingestão de alimentos contaminados por *E. coli* provoca infecção ou toxinfecção (Tondo & Bartz, 2014; WHO, 2017). Dentre as cepas patogênicas citadas de *E. coli*, o sorovar O157:H7 causa graves enfermidades. Os sintomas são, diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, podendo progredir para síndrome hemolítica urêmica (HUS). Doses infectantes pequenas (10 células ou menos) podem levar indivíduos a óbito (Forsythe, 2013).

Segundo a (WHO, 2017) a *E. coli* entero-hemorrágica está entre os principais patógenos alimentares que afetam milhões de pessoas anualmente, sendo ela associada as carnes mal cozidas, bem como outros alimentos. Em geral, alimentos como carnes *in natura*, de qualquer espécie animal (bovina, suína, aves, carnes de caça e exóticas) podem ser veículos de *E. coli*. Segundo ICMSF (2015), a população encontrada dessas bactérias em carnes cruas geralmente é de <10 UFC/g, e para carnes picadas o limite microbiológico tolerável é de até 10² UFC/g.

No estudo de Adwan et al. (2015), 40 amostras de carne (entre frescas e congeladas) compradas entre maio e junho de 2014, no distrito de Jenin (Palestina)

foram analisadas quanto à presença de alguns patógenos. Os resultados indicaram presença de microrganismos patogênicos, sendo a *E. coli* presente em 95% das amostras testadas. Já em pesquisa realizada por Brusa et. al (2013), de outubro de 2010 a julho de 2011 na Argentina, 450 amostras foram analisadas (90 amostras de carne moída crua e 360 amostras ambientais) e o resultado demonstrou que 25,5% da carne bovina e 4,4% das amostras ambientais foram positivas para *E. coli* O157:H7.

Esses estudos, entre outros nos reafirmam o quão é importante se ter uma atenção especial voltada à esse microrganismo em questão, pois como já dito anteriormente, o mesmo está diretamente relacionado a doenças transmitidas por alimentos (DTA).

2.7 Legislação - Controle de tempo versus temperatura

Já se sabe que para evitar multiplicação, sobrevivência e resistência de microrganismos, o controle de tempo versus temperatura é um dos principais fatores. Para que haja um controle nos surtos alimentares, os serviços de alimentação devem adotar esse método de controle, a fim de garantir segurança e inocuidade dos alimentos que são servidos para consumo ao consumidor (WHO, 2006).

A Organização Mundial da Saúde sugere que os alimentos em geral atinjam 70 °C durante o cozimento (WHO, 2006). O *Codex Alimentarius Commission* recomenda que o tempo e a temperatura dos alimentos cozidos oferecidos em serviços de alimentação, devem ser suficientes para garantir a destruição de microrganismos patogênicos não produtores de esporos (WHO, 1993).

No entanto, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e o Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar dos Estados Unidos (FSIS) (USDA, 2019) a temperatura interna mínima de pedaços de carne bovina processados termicamente deve ser de 62,8° C (145°F) deixando o alimento em repouso por pelo menos 3 minutos antes de servi-lo. Já a Agência Canadense de Inspeção de Alimentos – CFIA – (Governo do Canadá, 2015) orienta que a temperatura interna mínima da carne bovina deve ser de 63° C (145° F) para carnes mal passadas, pelo menos 71° C (160° F) para carnes ao ponto e pelo menos 77° C (170° F) para carnes bem passadas. As normas européias preconizam uma redução de 6 log (6D) do microrganismo *Listeria monocytogenes*, mesmo esse, sendo um patógeno resistente ao calor de importância em alimentos refrigerados (ECFF, 2006). Porém, o FSIS determina que, os

estabelecimentos devem entregar alimentos após uma redução de $5,0\text{-log}_{10}$ de *E. coli* O157: H7 em produtos fermentados contendo carne bovina USDA-FSIS (2001).

No Brasil, a Resolução – RDC N° 216, de 15 de setembro de 2004, que dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação preconiza que o tratamento térmico deve garantir que todas as partes do alimento atinjam a temperatura de, no mínimo 70° C e caso temperaturas inferiores sejam utilizadas, a combinação tempo e temperatura deve ser suficiente para assegurar a qualidade higiênico-sanitária do alimento (BRASIL, 2004). Duas outras legislações regionais brasileiras (RIO GRANDE DO SUL, 2009 e SÃO PAULO, 2013) determinam que os alimentos devem ser completamente tratados termicamente a, no mínimo, 70° C e 74° C, respectivamente, ou por outras combinações de tempo e temperaturas seguras.

Avaliando em um aspecto geral, etapas como recebimento, manipulação, preparo, exposição, armazenamento e distribuição dos estabelecimentos de alimentação necessitam de um controle mais rigoroso de tempo e temperatura. Essas etapas devem ser controladas rigorosamente, uma vez que, nesses estabelecimentos são manipulados muitos alimentos perecíveis que possuem pouco tempo de vida útil (Cônsoi, 2009; Da Cunha, Stedefeldt, & de Rosso, 2014).

Portanto, algumas preparações da alta gastronomia, embora sejam realizadas em diferentes países há um longo tempo, não foram relatadas como causadoras de surtos alimentares. No entanto continuam desalinhadas com os parâmetros estabelecidos pela legislação para a segurança de alimentos, além de ainda não terem sido validadas com os parâmetros de tempo e temperatura utilizados. Contudo é de insuma importância a avaliação desses parâmetros como tempo e temperatura escolhidos para investigar a eficácia do tratamento térmico, com o intuito de avaliar se confere segurança microbiológica.

2.8 Espectrometria de massa por ionização por dessorção assistida por matriz de tempo de laser (MALDI – TOF MS)

Na última década, estudos vêm sendo realizados com o intuito de diminuir o tempo que os pesquisadores levam para realizar análises laboratoriais, visto que a quantidade de mão de obra empregada também é um fator que influencia nos resultados. O principal objetivo desses estudos é descobrir e aperfeiçoar técnicas que

sejam precisas na identificação de patógenos transmitidos por alimentos, identificação rápida de bactérias, identificação de culturas *starters* e probióticos, bem como nos diagnósticos fornecidos (Jasson, Jacxsens, Luning, Rajkovic, & Uyttendaele, 2010; Pavlovic, Huber, Konrad & Busch, 2013).

Entre os principais métodos de pesquisa da atualidade, a ionização por dessorção a laser auxiliada por espectrometria de massa e tempo de voo (MALDI-TOF/MS) foi considerada um método revolucionário de diagnóstico direto para identificação fenotípica e molecular, e discriminação de vários tipos de microrganismos como bactérias e fungos (Lavigne et al., 2013; Elbehiry et al., 2017).

Segundo Chong et al (2018) a identificação de microrganismos pelo método MALDI-TOF/MS é menos complicada que os métodos tradicionais de identificação já conhecidos. Por esse fator não requer quantidade de mão de obra tecnicamente qualificada, o que nos leva a uma redução no tempo da identificação de patógenos (Carbonnelle et al., 2011; Lavigne et al., 2013; Theparee et al., 2018).

Mesmo possuindo inúmeras vantagens a identificação por MALDI-TOF/MS é limitada, uma vez que seu banco de dados de microrganismos deve ser alimentado constantemente (Lavigne et al., 2013; Chong et al., 2018). León e pesquisadores foram os primeiros a realizar estudos em 2007 utilizando análises de MALDI-TOF para traçar o perfil proteico de nematoides com um genoma não identificado. Em 2009, Wang e colaboradores utilizaram o mesmo método de análise para identificar proteínas de um platelminto. Um estudo recente realizado por Nagorny et al (2019) concluiu que o método de análise por MALDI-TOF também pode ser uma ferramenta efetiva na identificação de parasitas.

O método consiste na aplicação de espectrometria de massa à microbiologia. Em um primeiro momento o material biológico (colônia pura) deve ser preparado para então ser depositado em uma placa metálica com 384 poços (*spots*), após a amostra se fixar na placa é adicionada uma matriz polimérica. Esta reação é bombardeada com um laser que vaporiza a amostra, que chega aos detectores, os quais registram o tempo em que a substância chega ao detector e sua quantidade. Para cada amostra é gerado picos diferentes de acordo com o tempo de chegada ao detector (*time off light*). Assim, os detectores irão identificar os microrganismos através de impressões digitais das proteínas sendo correlacionadas aos espectros já existentes em um banco de dados (Pasternak, 2012).

Através dos picos gerados podemos realizar a interpretação dos dados que se apresentam em forma de “score”. Esse “score” é o quão similar a amostra identificada é em relação ao banco de dados. Resultados com “score” de 0 – 1699 são indicativos de nível de confiança insuficiente (vermelho), 1700 – 1999 provável nível de gênero (amarelo), 2000 – 2299 nível de gênero, provável espécie (verde) e 2300 – 3000 nível de espécies (verde).

2.9 Microbiologia Preditiva

Estudos quanto à microbiologia preditiva vem sendo, cada vez mais realizados, pois a exigência do consumidor pela qualidade da carne vem aumentando ao longo dos anos. Com intuito de garantir um produto mais seguro para o consumo humano, esses estudos tem como objetivo revisar o processamento do alimento como um todo e verificar os níveis de microrganismos presentes nos produtos até o final de sua vida de prateleira (Silva et al., 2016).

A microbiologia preditiva possibilita prever quantitativamente a resposta do comportamento do microrganismo frente às variações de fatores como temperatura, umidade, pH e condições de armazenamento, que podem influenciar nas condições de multiplicação e inativação de microrganismos presentes no alimento. É um elemento essencial à microbiologia de alimentos, pois permite analisar riscos, avaliar a vida de prateleira, desenvolver novos produtos e processos, auxiliar tomadas de decisões e, portanto possibilita melhorias na qualidade e na segurança dos alimentos (Ferrer et al., 2009; Oliveira et al., 2013). Com a microbiologia preditiva, o objetivo do trabalho é delinear o comportamento dos microrganismos (multiplicação, inativação e sobrevivência) mediante uma condição ambiental através de modelos matemáticos, bem como desenvolver um modelo de inativação térmica (Haberbeck, 2011; Elias, 2014).

Os modelos matemáticos podem ser classificados como modelos primários, secundários e terciários. Os modelos primários descrevem a dinâmica da população microbiana em função do tempo, sob determinadas condições ambientais e de cultivo, e são utilizados como parâmetros do modelo o número inicial de células, taxa de multiplicação, tempo da fase lag e densidade populacional máxima (Whiting & Buchanan 1994). Os modelos secundários descrevem a variação dos parâmetros cinéticos em função da variação de uma condição ambiental. Por fim, os modelos

terciários utilizam um ou mais modelos secundários e primários para gerar um *software* que possibilita calcular e comparar as respostas microbianas em diferentes condições e contrastar com o comportamento de outros microrganismos (Whiting, 1995; Mcdnald, Sun, 1999; Mceekin et al., 2002; Kajak, Kolozyn-Krajewska, 2006; Mars, 2008). Alguns programas facilitam a modelagem das curvas de multiplicação e de inativação microbiana sob diferentes condições, sendo os mais utilizados os *softwares Pathogen Modeling Program, ComBase Predictive Models e GlnaFit* (Geeraerd; Herremans; Van Impe, 2000; Ross, Mcmeekin, 2003). Sendo esses de fácil utilização e acesso livre aos pesquisadores (McMeekin & Ross, 2002).

O *software GlnaFit* vem sendo utilizado para avaliar a inativação de microrganismos, sendo um complemento gratuito do *Microsoft® Excel* (Ng et al., 2016; Wang et al., 2016; Maresca, Ferrari, 2017), através do desenvolvimento de modelos de predição por meio de ferramentas avançadas de regressão não linear (Geeraerd et al., 2000; Geeraerd, Valdramidis, & Van Impe, 2005). Podem ser testados nove tipos diferentes de modelos de inativação microbiana: Regressão Log-Linear; Modelo Log-Linear + Ombro; Modelo Log-Linear + Cauda; Modelo Log-Linear + Ombro + Cauda; Modelo de Weibull; Modelo de Weibull corrigindo parâmetro p; Modelo de Weibull + Cauda; Modelo Bifásico; Modelo Bifásico + Ombro.

A qualidade dos modelos é avaliada através do cálculo do coeficiente de determinação (R^2 , Equação 1) e da raiz do erro quadrático médio (RMSE, Equação 2) (Wang et al., 2013). Através desse *software* é possível prever o comportamento microbiano na preparação estudada, correlacionando com os parâmetros monitorados.

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

onde, \tilde{N} é o número de pontos no conjunto de dados; y_i é o valor observado; \hat{y}_i é o valor predito.

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

Onde, n é o número de observações; μ é o valor observado e $\hat{\mu}$ é o valor predito.

O modelo escolhido pelo usuário será aquele onde os resultados obtidos na pesquisa sejam o mais próximo possível da predição do modelo. Ou seja, aquele modelo que obtiver os melhores parâmetros de R^2 e RMSE. Assim, o modelo matemático irá prever a inativação microbiana nos medalhões de filé mignon contaminados artificialmente com um *pool* de *E. coli*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

No período de maio de 2018 a dezembro de 2018 foram realizados experimentos de inativação microbiológica em medalhões de filé mignon bovino, no Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande Sul (ICTA/UFRGS), com a cooperação do Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS.

3.1 Obtenção e preparo das amostras de filé mignon

Foram realizadas compras de peças de filé mignon (*psoas major muscle*) embaladas a vácuo e refrigeradas em um mercado na cidade de Porto Alegre / RS. Sendo posteriormente transportadas sob refrigeração ($<7^{\circ}\text{C}$), dentro de bolsas térmicas para o Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS) onde as preparações foram realizadas. No laboratório, as peças foram armazenadas em temperatura de refrigeração ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$), até o momento de preparação dos experimentos. Peças inteiras de filé mignon foram cortadas em um total de 40 peças de carne com peso de $100\text{g} \pm 5,0\text{ g}$ e espessuras máximas de 5cm (Mario Di Remigio, 1997), as quais foram divididas em triplicatas. Cada peça foi submersa em um pool bacteriano utilizado como inóculo e posteriormente colocada em um saco estéril. Duas triplicatas de amostras foram designadas controle negativo (amostras que não foram submetidas ao inóculo).

3.2 Análise de parâmetros intrínsecos

O pH e atividade de água (a_w) de cada amostra de carne foram mensurados, em um pHmetro (modelo:HANNA HI-2221 Calibration Check pH Bench Meter) e em um medidor de atividade de água (modelo: Rotronic Hygropalm AW1), respectivamente.

3.3 Cepas bacterianas e preparação de inóculo

Três cepas de *Escherichia coli* foram utilizadas para formar um *pool*, utilizado como inóculo: *E. coli* CQ (isolada de cachorro-quente vendido nas ruas de Porto Alegre, Brasil), *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* ATCC 8739, as quais pertencem à coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS). Todas as cepas foram cultivadas separadamente em 10mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI;

Merck, Darsmtadt) em duplicata a 37°C, durante 18-24 h. Após, cada tubo de cada cultura foi centrifugado (centrífuga Hettich Mikro 120) em temperatura ambiente, por 5 minutos, a 14.000 rpm, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com 2mL de solução de água peptonada 0,1% (Merck, Darsmtadt).

Esse procedimento foi repetido por duas vezes, sendo que na segunda vez, as células de cada tubo foram ressuspensas em 10 mL de solução de água peptonada 0,1% (Merck, Darsmtadt). O volume final do *pool* foi de 60 ml, após a ressuspensão, quando foi transferido para um Becker de 1000mL. Neste Becker, foram adicionados 540mL de água peptonada 0,1% estéril, perfazendo um total de 600mL. Cada pedaço de filé contendo 100g foi mergulhado durante dois minutos nessa suspensão, com o objetivo de atingir um inóculo inicial de aproximadamente 7.0 log UFC/g (foi realizado contagem em placa para obtermos essa informação), conforme preconizado pela *International Commission on Microbiological Specifications for foods - ICMSF 8* (ICMSF, 2011) para ensaios de inativação térmica.

3.4 Aplicação processo *Sous vide* – Procedimento experimental

As amostras de carne bovina contaminadas foram acondicionadas dentro de sacos plásticos estéreis, sendo selados a vácuo em uma seladora (modelo: Fastvac F2000) (Figura 1). Em seguida, as amostras foram transferidas para um termocirculador e então submersas em água com temperatura de 54°C, por 24 horas. As temperaturas das peças de filé mignon foram avaliadas por termopares do tipo K, introduzidos na parte central das mesmas. Foi adicionado um vedante para que o vácuo fosse mantido dentro das embalagens plásticas. Os termopares foram conectados em equipamento Datalogger TENMARS, modelo TM-747 DU, calibrado, com quatro canais de medição simultâneos. As leituras de temperaturas foram realizadas a cada hora. Um esquema está representado na (Figura 4). Essa temperatura foi escolhida por ser uma das temperaturas mais baixas utilizadas em processamento *Sous Vide* e o tempo por ser um dos mais longos utilizados em receitas de gastronomia (Baldwin, 2008). Foram estipulados tempos para as análises microbiológicas. A cada tempo estipulado (Controle 0h, 0, 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 24 horas e controle 24h), uma triplicata de peças de carne foi retirada do termocirculador e colocada em um banho de gelo, com o intuito de parar o tratamento térmico.

3.5 Análises Microbiológicas

Posteriormente, foram retirados 25g de cada peça de carne da triplicata, as quais foram diluídas em 225mL de água peptonada 0,1% (Merck, Darsmtadt), formando a diluição 10^{-1} que foi então homogeneizada em equipamento Stomacher (Stomacher 400, Seward London Clinical), durante 5 minutos. Diluições decimais seriadas foram realizadas e alíquotas de 1mL de cada diluição e foram inoculadas pelo método *Pour plate* em meio seletivo VRBA + MUG (Merck, Darmstadt). Paralelamente, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em placas com meio BHI (Himedia, Mumbai), com o auxílio de uma alça de Drigalski, utilizando o método de espalhamento (*spread plate*) em placa. As placas de Petri contendo os meios VRBA + MUG, bem como as placas contendo BHI (Merck, Darsmtadt) foram incubadas a 37°C, por 18-24horas, e as contagens das colônias foram realizadas após a incubação. Colônias roxo-azuladas em formato puntiforme foram contadas em placas VRBA + MUG, dentro de uma câmara com luz UV de comprimento de onda de 365nm para identificação de *E. coli* (Davidson, Roth, & Gambrel-Lenarz, 2004) e todas as colônias foram contadas em placas contendo meio BHI. Foi utilizado o meio BHI pois segundo Peixoto et al. (2019) o crescimento de colônias foi melhor.

Todas as contagens bacterianas foram realizadas em triplicata e os experimentos foram repetidos três vezes, separadamente. Os resultados das contagens microbianas foram expressos em escala logarítmica de Unidades Formadoras de Colônias por grama (log UFC/g).



Figura 1: Pedacos de filé mignon sendo submetidos ao processo de retirada do ar dos sacos plásticos pela seladora a vácuo.

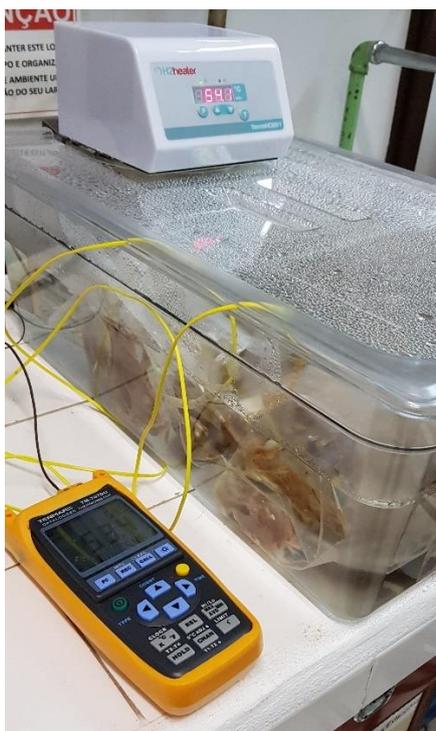


Figura 2: Pedacos de filé mignon sendo submetidos ao processo térmico do tipo *sous vide*, com os termopares inseridos no centro dos filés e um termopar na água do termocirculador.

3.6 Análise da microbiota da carne por espectrometria de massa MALDI-TOF/MS

As alterações da microbiota das preparações de carne, antes, durante e após o processamento em todas as peças foram investigadas através de análises de Espectrometria de Massa Associada a Dessorção/Ionização de Matriz Assistida por Laser (MALDI-TOF/MS), no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS, em um aparelho MALDI Biotyper 4.0, software MBT OC. Através dessa técnica, as espécies bacterianas presentes nas matérias-primas, assim como aquelas que persistiram durante e após o processamento das carnes foram identificadas. Foram realizadas análises de MALDI-TOF em colônias de morfologias diferentes de todos os tempos que houve crescimento bacteriano nas placas de meio BHI. As mesmas foram isoladas, a fim de serem obtidas colônias puras com 24h, as quais foram transferidas separadamente, para tubos *Eppendorf* com 300 μ L de água Mili-Q. Após breve homogeneização no equipamento vortex (Biomatic aparelhos científicos), 900 μ L de etanol PA (Êxodo científica) foram adicionados, e

então centrifugados (Minispin® PLUS EPPENDORF) a velocidade de ≥ 13.000 rpm, por 2 minutos. Foi retirada a fração do álcool com auxílio de uma micropipeta e o complexo etanol-pellet foi deixada durante três minutos para secagem a temperatura ambiente. Foi adicionado ácido fórmico 70% (25 μ L) (Dinâmica) ao sedimento e então foram adicionados 25 μ L de acetonitrila (LiChrosolv®) pura, a qual foi homogeneizada e então centrifugada (Minispin® PLUS EPPENDORF) por 2 minutos a uma velocidade de ≥ 13.000 rpm. Foi pipetado 1 μ L de sobrenadante sobre uma placa metálica, deixando secar por completo à temperatura ambiente. Antes da análise ser realizada, adicionou-se 1 μ L de solução de ácido α ciano - 4- hidroxicinâmico (HCCA) (Bruker Daltonics, 2015). Após secagem em fluxo de ar, a placa foi introduzida no equipamento, para, sob vácuo, ser analisada, sendo submetida a pequenos pulsos laser, propiciando a ionização da amostra. De acordo com o tempo de voo (TOF) do analito até o detector, no final do tubo a vácuo, as características do espectro foram geradas, permitindo a identificação dos microrganismos até o nível de espécie (Bruker Daltonics, 2015).

3.7 Teste de inativação completa de *Escherichia coli*

A fim de avaliar a inativação completa (≤ 1 UFC/g) das *E. coli*, foram realizadas análises de presença ou ausência nas amostras de carne processadas em *Sous Vide* nos tempos (4, 5, 6, 7, 8, 9 e 24 horas). As contagens foram iniciadas em 4 horas, pois a partir desse tempo foi observado uma diminuição expressiva nas contagens de *E. coli*. Em cada um desses tempos, após análises microbiológicas serem realizadas, as peças de carne foram incubadas novamente a 37°C, por 24h, sendo realizadas análises microbiológicas para identificação da presença de *E. coli*, após o período de incubação descrito. Para tanto, 25g de cada amostra foram diluídas em 225mL de água peptonada 0,1% (Merck, Darsmtadt), formando a diluição 10^{-1} , a qual foi então homogeneizada em equipamento Stomacher (Stomacher 400, Seward London Clinical), durante 5 minutos. Alíquotas de 1mL foram inoculadas pelo método *Pour plate* em meio seletivo VRBA (Merck, Darmstadt) adicionado de MUG (Oxoid, Hampshire). As placas de Petri contendo o meio VRBA + MUG foram incubadas a 37°C, por 18-24horas. Após o período de incubação, foi analisada a presença/ausência de *E. coli* nas placas.

3.8 Modelagem matemática

Os dados experimentais de inativação térmica das amostras de filé mignon contaminados com *E. coli* foram ajustados aos modelos gerados pelo *software GInaFIT* (Geeraerd e Van Impe *Inactivation Model Fitting Tool*) versão 1.6. Parâmetros de K_{max} foram obtidos através do *software* a partir do modelo mais adequado e o valor D foi calculado segundo a fórmula $D = 2,303 / K_{max}$ (Lahou et al., 2015). Para a adequação aos modelos gerados, calculou-se o coeficiente de determinação (R^2) e do erro quadrático médio (RMSE).

3.9 Análise estatística

A atividade de água, pH e contagens de microrganismos mesófilos totais (Tabela 1) das amostras de carne bovina foram analisadas quanto a diferenças significativas ($p \leq 0,05$), empregando análise de variância de um fator (ANOVA) e teste de Tukey, através do *software SAS Studio®* (SAS Institute Inc., Cary, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fatores intrínsecos e carga microbiana inicial das peças de filé mignon.

Os resultados de pH e a_w não diferiram significativamente antes e após o tratamento térmico *Sous vide*, apresentando valores de a_w $0,995 \pm 0,004$ para amostras do controle negativo e $0,985 \pm 0,004$ para amostras do controle positivo e valores de pH $5,34 \pm 0,3$ para amostras do controle negativo e pH $5,75 \pm 0,2$ para amostras do controle positivo. Os valores de pH e a_w dos filés mignon, antes do tratamento, estavam adequados, de acordo com ICMSF (2011) e demais estudos que avaliaram pH e a_w em carnes bovinas tratadas termicamente (Duan et al., 2016; Becker et al., 2015). Foram obtidos $6,13 \pm 0,84$ log UFC/ g de contagem total de mesófilos nos controles, no tempo 0 (Tabela 1), e esses resultados estão de acordo com estudos realizados com carne bovina no Brasil por Becker & Kiel (2016) e Peixoto et al. (2019). No presente estudo as contagens totais de mesófilos, foram expressivamente maiores que as contagens encontradas pelos pesquisadores Silva et al. (2016) que encontraram $2,93 \times 10^2$ UFC/g e Becker et al. (2015) que encontraram $3,47 \pm 0,76$ log UFC/ g de contagem total de mesófilos em seus estudos.

No tempo 9 horas foi possível observar uma diminuição de 4 logs UFC/g de mesófilos totais, obtendo uma contagem de $2,40 \pm 0,00$ log UFC/g. Nos controles no tempo 24 horas (Tabela 1), foram obtidos $4,22 \pm 0,00$ log UFC/g e uma diminuição de aproximadamente 2 logs UFC/g das contagens iniciais, das peças de carne.

Tabela 1.

Contagem de mesófilos totais em peças de filé mignon bovino, embalado a vácuo, imerso em termocirculador de água com temperatura de 54° C.

Tempo do processo (horas)	Contagem Controle (log ₁₀ UFC/g ± DP)	Contagem <i>E. coli</i> (log ₁₀ UFC/g ± DP)
0	6,13 ± 0,84 ^a	6,72 ± 0,34 ^a
1	-	5,53 ± 0,38 ^{ab}
4	-	4,75 ± 0,36 ^{abc}
5	-	4,90 ± 0,61 ^{ab}
6	-	3,00 ± 0,68 ^{bcd}
7	-	3,90 ± 0,66 ^{bcd}
8	-	ND
9	-	2,40 ± 0,00 ^d
24	4,22 ± 0,00 ^{abc}	2,82 ± 0,60 ^{cd}

D: Desvio padrão; ND: Não detectado (<10 UFC/g). Letras alfabéticas diferentes na mesma coluna, correspondem à diferença significativa (p <0,05).

4.2 Inativação térmica de *Escherichia coli*

Análises microbiológicas identificaram que a concentração inicial média de *E. coli* nos filés mignon crus foi de 7,7 ± 0,1 log UFC/g. Os resultados demonstraram que a temperatura do centro da carne alcançou a temperatura de 54,5 ± 0,1° C em 45 minutos e manteve-se assim por todo processo. Como esperado, ao longo do processo térmico pôde-se observar que quanto maior o tempo de tratamento, maior foi a redução da quantidade de *E. coli*. Em 1 hora de cocção a contagem de *E. coli* foi de 4,17 ± 0,1 log UFC/g, diminuindo nos tempos seguintes. Outros estudos relatam que o processo térmico por longos períodos em temperaturas de 50°C a 62°C reduziram significativamente contagens de microrganismos mesófilos totais, bem como psicrotróficos, em carne bovina (Botinestean et al., 2016; Hansen et al., 1995;

Vaudagna et al., 2002). No presente estudo, as populações de *E. coli* nos pedaços de filé mignon foram reduzidas em torno de 3 logs UFC / g em 5 horas (Tabela 2) e, em 6 horas, de tratamento térmico não foi possível observar crescimento bacteriano sobre as placas (Tabela 2). No entanto, no teste de inativação completa, nos tempos de 7 horas e 8 horas, houve a presença de 1 e 2 colônias respectivamente de *E. coli*. Depois de 9 horas não houve mais detecção de *E. coli*, e a inativação desse microrganismo foi considerada completa.

Tabela 2.

Inativação térmica de *Escherichia coli* em peças de carne bovina (medalhões de filé mignon) a vácuo imersas em termocirculador com água a 54 °C.

Tempo total do processo (min.)	Temperatura média do centro da carne (°C ± SD)	Média dos sobreviventes de <i>E. coli</i> (log ₁₀ CFU/g ± SD)	Amostras positivas para <i>Escherichia coli</i> pelo teste de inativação completa
0	23.6 ± 0.1	5.91 ± 0.50 ^a	-
1	54.5 ± 0.1	4.17 ± 0.18 ^b	-
4	54.6 ± 0.1	2.52 ± 0.24 ^c	3/3
5	54.6 ± 0.0	2.48 ± 0.13 ^c	3/3
6	54.5 ± 0.1	ND	3/3
7	54.5 ± 0.0	ND	1/3
8	54.5 ± 0.0	ND	2/3
9	54.5 ± 0.1	ND	0/3
24	54.6 ± 0.1	ND	0/3

SD, standard deviation; ND, Not detected (<10 CFU/g).

Becker et al. (2015) realizaram um estudo com carne suína contaminada com *L. monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis e *E. coli* O157:H7 e observaram que após 10 horas a 53°C houve uma redução de 5-log UFC/g. Os autores ainda demonstraram que ao reduzirem o tempo de processamento de 10 horas para 3 horas com a mesma temperatura de 53°C, *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* foram completamente inativadas. Em contraste, *E. coli* O157:H7 foi detectada, após esse período. Esses resultados estão de acordo com os apresentados no presente estudo, uma vez que contagens de 2,52 ± 0,24 UFC/g de *E. coli* foram encontradas depois de 4 horas de tratamento térmico a 54°C. No entanto, em estudo realizado por Gunvig et al.

(2012) com carne bovina contaminada com *L. monocytogenes*, no qual foram analisados três tempos e três temperaturas diferentes, foram demonstradas reduções de > 6,7 log, após 300 min. a 53° C, 30 min. a 58°C e/ou 20 min. a 60° C. Em outro estudo, realizado por Christensen et al. (2010), os processos térmicos a 53°C e 58°C, por 8 horas (incluindo tempo de aquecimento e retenção), foram considerados seguros, uma vez que garantiram reduções de >5 log UFC/ g de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em carne suína. Sun et al. (2017) trataram carne bovina pelo método *Sous Vide* após contaminá-la com *E. coli* O157:H7. Os autores avaliaram o tratamento térmico associado ao HPP (processamento de alta pressão) com duas diferentes pressões, 450 MPa e 600 MPa, e tempos diferentes, 15 min. e 10 min., respectivamente. Os resultados demonstraram que o aumento da pressão resultou em maior redução de *E. coli* O157:H7. Eles observaram que em 15 min. houve redução de 4,74 log UFC/g e, em 10 min., uma redução de 6,13 log UFC/g.

Jeong et al. (2018) constataram em seu estudo que o sistema *Sous Vide* foi suficiente para pasteurizar a carne suína, utilizando diferentes combinações de temperatura (61° C ou 71° C), tempo (45 ou 90min) e grau de vácuo (98,81% ou 96,58%). Inicialmente as contagens totais de microrganismos e de coliformes do presunto suíno foram de 8,46 e 3,67 UFC/g, respectivamente. Após o *Sous vide* não foi observado crescimento microbiano nas amostras. De acordo com Hernandez et al. (2018), patógenos mesófilos podem ser inativados por temperaturas tão brandas quanto 50 – 62 °C, desde que o tempo de tratamento seja suficientemente longo, no entanto temperaturas mais altas são necessárias para evitar a sobrevivência de patógenos termorresistentes sobreviventes. A *E. coli* por ser um microrganismo mesófilo não esporulado, não costuma ser um patógeno preocupante, pois não é tolerante ao calor e em condições de refrigeração adequada não pode se reproduzir (Hernandez et al., 2018).

No presente estudo, a inativação completa de *E. coli* ($7,7 \pm 0,1$ log UFC/g) ocorreu em a 54°C em 9 horas, atendendo e ultrapassando a redução mínima de 5 log UFC/ g de *E. coli*, preconizada pelo USDA-FSIS (2001), para produtos cárneos. Nesta temperatura e tempo, as carnes permaneceram internamente rosadas e com um leve aspecto de cozimento na superfície (aspecto de carne ao ponto para menos), ao contrário do que acontece quando a carne atinge o ponto de cocção recomendado pela legislação brasileira (70° C em todas as partes do alimento). No entanto, nos

resultados do presente estudo, foi possível observar que o centro da carne manteve-se com cor rosada (Figura 3), demonstrando que a inativação da *E. coli* não teve relação com o fato de o centro da carne estar visivelmente bem cozido ou mal cozido.

Diversos padrões de tempos e temperaturas têm sido recomendados para a cocção de alimentos em geral *Sous Vide*. De acordo com Mario Di Remigio (1997), as temperaturas de cozimento pelo *Sous Vide* variam de 65° C a 95° C, no entanto outros autores relatam que temperaturas de 50° C a 95°C, durante períodos que variam de 30 min a 72 horas (Baldwin, 2012; Karyotis et al, 2017; Hernandez et al, 2018). Douglas Baldwin (2008) relata que carnes em geral podem ser preparadas e cozidas pelo *Sous Vide* em termocirculador com água a 54,4° C por 24 horas.

Foi realizado o ajuste da curva de sobrevivência de *E. coli* em filés mignon processados a 54° C. O modelo de inativação selecionado e utilizado para representar essa curva foi o de Geeraerd tail (Geeraerd et al.,2000). O ajuste foi satisfatório com R² de 0,95 (quanto mais próximo a 1 melhor é o ajuste dos dados experimentais ao modelo escolhido), R² adj de 0,93, RMSE de 0,56 (quanto mais próximo a 0 melhor é o ajuste dos dados experimentais ao modelo escolhido) e a Média da Soma dos Erros Quadráticos 0,32 (Geeraerd et al., 2000; Geeraerd et al., 2005). Na Figura 4 está demonstrado que a curva de sobrevivência foi linear, indicando que a inativação da *E. coli* seguiu uma cinética de primeira ordem. O valor D_{54oC} foi de 1,17 horas. Em recente estudo realizado por Peixoto et al. (2019), foram testadas duas técnicas diferentes de fritura com intuito de avaliar a inativação microbiana de filés mignon. Esses pesquisadores encontraram diferentes valores D que o presente estudo. Para técnica 1 (carne frita em frigideira seguido de aquecimento ao final em forno após a fritura) o valor D foi de 1,67 min e para técnica 2 (carne frita tendo o controle do ponto de cozimento pelo acompanhamento da temperatura central da carne) foi de 3,81 min. Podemos associar essa diferença dos valores D devido as altas temperaturas de fritura e forno que foram empregadas, diferentes do presente estudo, onde a temperatura de 54° C sem manteve por todo o período de cocção.



Figura 3: Aspecto visual da carne processada a 54° C por 9 horas em um circulador de água com temperatura controlada.

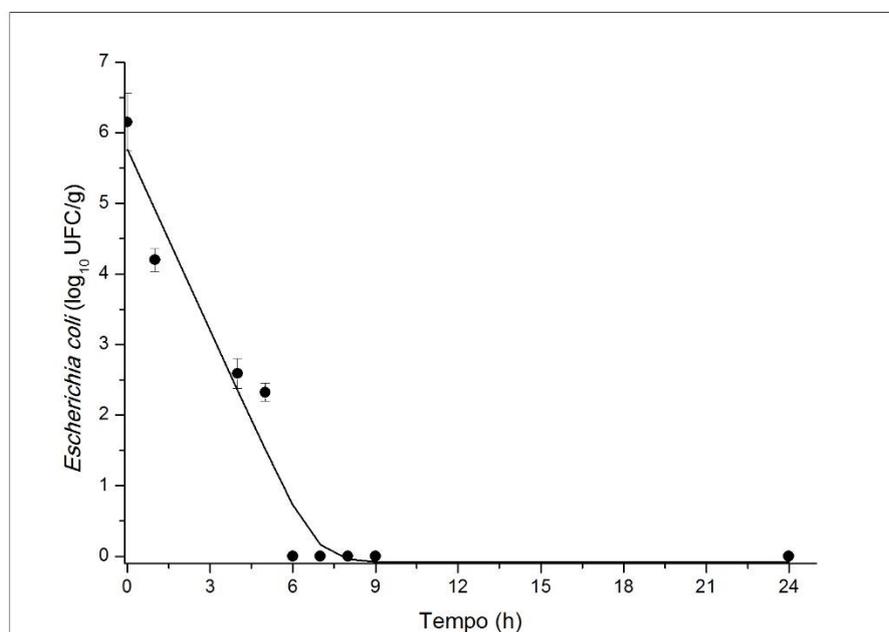


Figura 4: Curva de inativação de *Escherichia coli*. a 54° C, obtido pelo modelo de Geeraerd tail. ●: pontos experimentais-: curva estimada pelo modelo de inativação.

4.3 Análise da microbiota natural das amostras de carne bovina por espectrometria de massa MALDI-TOF/MS.

O presente estudo avaliou a microbiota natural (amostras não contaminadas) das amostras de carne de filé mignon, antes (tempo zero), nos tempos 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 horas (tempos “durante o processo”) e após as 24 horas de tratamento térmico pelo *Sous Vide*. Os resultados podem ser observados na Tabela 3.

CARNE CRUA	DURANTE O PROCESSO	24 HORAS
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Kocuria rhizophila</i> • <i>Micrococcus luteus</i> • <i>Lactobacillus sakei</i> • <i>Staphylococcus warneri</i> • <i>Staphylococcus equocum</i> • <i>Acinetobacter haemolyticus</i> • <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> • <i>Staphylococcus haemolyticus</i> • <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Hafnia alvei</i> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Planibacillus sp.</i> • <i>Lactonabillus sakei</i> • <i>Arthrobacter oxydans</i> • <i>Staphylococcus cohnii</i> • <i>Staphylococcus hominis</i> • <i>Corynebacterium xerosis</i> • <i>Staphylococcus epidermidis</i> • <i>Staphylococcus haemolyticus</i> • <i>Staphylococcus saprophyticus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus licheniformis</i> • <i>Pseudomonas stutzeri</i> • <i>Staphylococcus warneri</i> • <i>Staphylococcus hominis</i> • <i>Staphylococcus epidermidis</i>

Tabela 3: Microbiota encontrada nas peças cruas de filé mignon e filé mignon após 24 horas de tratamento térmico *Sous vide*.

Como esperado, a diversidade de espécies bacterianas inicialmente na carne crua foi grande, apresentando representantes Gram positivos e Gram negativos. Outros estudos demonstram diversidades ainda maiores (Hilgarth et al., 2017; Peixoto et al., 2019; Chen et al., 2019), porém é possível que nossos resultados tenham sido influenciados pela embalagem a vácuo das carnes utilizadas nesse estudo. De acordo com Creed (1998), o crescimento bacteriano, assim como a diversidade microbiana de carnes embaladas a vácuo podem ser reduzidos (Creed, 1998). Além disso, o vácuo pode selecionar diversas espécies bacterianas, as quais não estejam nos bancos de dados do MALDI-TOF, resultando em um número menor de espécies identificadas.

Microrganismos associados a deterioração da carne resfriada foram encontrados na carne crua do presente estudo, sendo alguns desses gêneros os seguintes: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Cornobacterium*, *Micrococcus* e *Lactobacillus*. Esses resultados são semelhantes aos dados encontrados no estudo realizado por Peixoto et al. (2019), que analisaram a microbiota da carne bovina, antes e após os pontos de grelha, além da inativação da *E. coli* em medalhões de filé mignon grelhados

em diferentes padrões de tempo e temperaturas. Esses autores encontraram as espécies *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* e *Pseudomonas* na carne crua e espécies como *Acinetobacter johnsonii*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp, *Enterobacter kobei*, *Exiguobacterium auranticum*, *Lactobacillus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas putida*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri* e *Wautersiella falsenii* na carne grelhada até o ponto bem passado, sendo *Acinetobacter johnsonii*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus* as principais gêneros encontrados. Embora contagens elevadas desses microrganismos possa ser um indicativo de deterioração, não foi observada nenhuma alteração organoléptica perceptível nas amostras utilizadas no experimento em questão. Espécies dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* foram encontradas ao final do processo térmico em ambos os estudos, indicando que esses gêneros foram resistentes ao tratamento térmico aplicado, no entanto esses microrganismos não são causadores de doenças transmitidas por alimentos. Os resultados do MALDI-TOF demonstraram a presença do gênero *Cornobacterium* no decorrer do processo de cocção e o gênero *Pseudomonas* foi identificado após 24 horas de tratamento. Bactérias do gênero *Staphylococcus* foram identificadas em todos os tempos de cozimento, incluindo o tempo de 24 horas, indicando que esse gênero foi resistente ao tratamento térmico. A partir do tempo 8 horas já não foi mais possível identificar a presença de *E. coli*, confirmando nossos resultados nas contagens em placas.

Em alguns tempos de cozimento houve um maior número de gêneros identificados que em outros, isso deve-se ao fato de que diferentes amostras de filé mignon, mesmo vindos de mesmos pacotes de filé, foram analisados em triplicata de experimento.

Os dados encontrados no presente estudo não tiveram a intenção de caracterizar toda a microbiota da carne bovina processada, uma vez que isso seria praticamente inviável, devido a limitação da biblioteca de espécies do MALDI-TOF e da provável grande variação na microbiota de diferentes pedaços de carne. A intenção foi identificar alguns microrganismos que resistiram ao processamento térmico e confirmar os resultados das contagens de *E. coli*.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o processo térmico *Sous Vide* foi capaz de inativar 5,9 log UFC/ g de *E. coli* inoculadas em carnes bovinas do tipo filé mignon, a uma temperatura de 54° C, por 9 horas. O modelo matemático confirmou esses resultados. Além disso, pôde-se observar através das análises do MALDI-TOF/MS que contagens de bactérias mesófilas totais foram significativamente reduzidas por esse tratamento térmico. Contudo, espécies do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* foram encontradas ao final do processo *Sous Vide*, indicando que esses gêneros foram resistentes.

Foi possível também observar que a temperatura do centro da carne atingiu $54,5 \pm 0,1^{\circ}$ C em pouco tempo (45 min), mantendo-se assim ao longo de todo processo, não colocando o produto em risco. Como esperado, ao longo do tratamento térmico, pode-se observar que quanto maior o tempo de tratamento, maior foi a redução da quantidade de *E. coli*.

Ainda que os resultados tenham demonstrado inativação completa do inóculo de *E. coli* em carne bovina tratada a 54°C, por 9 horas, é importante salientar que cada binômio de tempo e a temperatura utilizados em diferentes tratamentos *Sous vide* seja avaliado. Assim, a segurança de carnes tratadas por esse método pode ser garantida, evitando colocar em risco a saúde dos consumidores.

6. REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE REFEIÇÕES COLETIVAS. ABERC. **Mercado real**. São Paulo: 2018 Disponível em: <<http://www.aberc.com.br>>. Acesso em: 31 maio 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE FRANCHISING. ABF. São Paulo: 2018. Disponível em: <<https://www.abf.com.br/>>. Acesso em: 31 maio 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO. ABIA. São Paulo: 2016. Disponível em http://www.abia.org.br/vsn/tmp_2.aspx?id=294#sthash.ZOQ6DDaw.dpbs. Acesso em: 12 maio 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORES DE CARNE. ABIEC. Exportações brasileiras de carne bovina (Relatório 2015). São Paulo: 2018. Disponível em: < <http://www.abiec.com.br>>. Acesso em: 31 maio 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BARES E RESTAURANTES. ABRASEL. Belo Horizonte: 2012. Disponível em: <<http://www.abrasel.com.br/component/content/article/7-noticias/1031-120112-.html>>. Acesso em: 21 maio. 2018.
- ADWAN G M., ALQAREM B R., ADWAN K M. (2015). Prevalence of foodborne pathogens in meat samples in Palestine. *International Food Research Journal* 5:1806 - 1812.
- AGUILERA, J. M.; BLAZES, M. *Edible structures : the basic science of what we eat*. 2013. [s.l.] CRC Press.
- BALDWIN, D. E. *A Practical Guide to Sous vide Cooking*. 2008. Disponível em: <http://www.douglasbaldwin.com/sous-vide.htmls>. Acesso em agosto. 2018.
- BALDWIN D E. (2012). Sous vide cooking: A review. *International Journal of Gastronomy and Food Science* 1:15–30.
- BA H., VAN SEO H W., PIL-NAM S., KIM Y S., PARK B Y., MOON S S., *et al.*, (2018). The effects of pre-and post-slaughter spray application with organic acids on microbial population reductions on beef carcasses. *Meat Science* 137: 16–23.
- BARHAM P., SKIBSTED L H., BREDIE W L P., RISBO J., SNITKJAER P., MORTESEN L M. (2010). Molecular gastronomy: a new emerging scientific discipline. *Chemical reviews* 110 (4) :2313–65.

- BECKER A., BOULAABA A., PINGEN S., ROHNER A., KLEIN G. (2015). Low temperature, long time treatment of porcine *M. longissimus thoracis et lumborum* in a combi steamer under commercial conditions. *Meat Science* 110: 230–235.
- BECKER A K., KIEL G., (2016). Análise microbiológica de carne bovina in natura comercializada em supermercados de Cascavel - PR. *Revista Thêma et Scientia* 1 (2):149–155.
- BETTS G D. (1992). The microbiological safety of sous vide processing. Technical manual. Campden: Campden Food and Drink Research Association 39.
- BETTS G D. (1998). Critical factors affecting the safety of minimally processed chilled foods. In Ghazala, S. (Org.). *Sous vide and Cook–Chill Processing for the Food Industry*. Gaithersburg: Aspen Publishers 131–64.
- BORCH E., KANT-MUERMANS M L., BLIXT Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* 33 (1): 103–120.
- BOTINESTEAN C., KEENAN D F., KERRY J P., HAMILL R M. (2016). The effect of thermal treatments including sous-vide, blast freezing and their combinations on beef tenderness of *M. semitendinosus* steaks targeted at elderly consumers. *LWT – Food Science and Technology* 74:154–159.
- BRASIL. Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001 - Regulamento Técnico para Padrões Microbiológicos para Alimentos. 2001. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012_02_01_2001.html>. Acesso em: 25 maio 2018.
- BRASIL. Resolução- RDC N° 216, de 15 de setembro de 2004. Diário Oficial da União, 2004. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/RESOLU%25C3%2587%25C3%2583ORDC%2BN%2B216%2BDE%2B15%2BDE%2BSETEMBRO%2BDE%2B2004.pdf/23701496-925d-4d4d-99aa-9d479b316c4b>>. Acesso em: 05 jun. 2018.
- BRASIL. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. (Série A. N). Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2010. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/PDF/2014/setembro/22/Manual-VE-DTA.PDF>. Acesso em: 25 agosto 2019.

- BRASIL. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>. Acesso em: 22 setembro 2019.
- BRUKER, D. MALDI Biotyper 4.0 User Manual Revision B. 2-187. 2015.
- BRUSA V., ALIVERTI V., ALIVERTI F., ORTEGA E E de la T J H., LINARES L H., *et al.*, (2013). A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2 (171):1 - 6.
- CASSI D. (2011). Science and cooking: the era of molecular cuisine. *EMBO reports*. 12 (3):191–196.
- CARBONNELLE E., MESQUITA C., BILLE E., DAY N., DAUPHIN B., BERETTI J L., *et al.*, (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry* 44 (1): 104–9.
- CFIA – Canada Government. 2015. Safe internal cooking temperatures Chart (Food safety - General food safety tips). Canada: Health Canada - CFIA - Canadian Food Inspection Agency. Retrieved from <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/generalfood-safety-tips/safe-internal-cooking-temperatures-chart.html>.
- CHD. Expert, the Chicago-based foodservice data and analytics firm. **The White Table Segment: CHD Expert Evaluates the Fine Dining Landscape of the United States - CHD Expert.** (2016). Disponível em: <https://www.chd-expert.com/blog/press_release/the-white-tablecloth-segment-chd-expert-evaluates-the-fine-dining-landscape-of-the-united-states/>. Acesso em: 02 abril 2018.
- CHEN X., ZHANG Y., YANG X., HOPKINS D L., ZHU L., DONG P., *et al.*, (2019). Shelf-life and microbial community dynamics of super-chilled beef imported from Australia to China. *Food Research International* 120: 784–792.
- CHPYK J., MOORE R M.,DISPIRITO Z., STROMBERG Z R., LEWISG L., RENTER D G., *et al.*, (2016). Presence of pathogenic *Escherichia coli* is correlated with bacterial community diversity and composition on pre-harvest cattle hides. *Microbiome* 4(9): 1–11.
- CHONG Y K., HO C C., LEUNG S Y., LAU S K P., WOO P C Y. (2018). Clinical Mass Spectrometry in the Bioinformatics Era: A Hitchhiker’s Guide. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 16: 316–334.

- CHRITENSEN L., TORNGREN M A., GUNVIG A. (2010). How to obtain safe and tender pork when cooking at “low temperature, long time” (LTLT). 56th International Congress of Meat Science and Technology. August 15–20, Jeju, South Korea (pp. 127).
- CÔNSOLI M A. (2009). **Análise dos aspectos relevantes para integração na cadeia de suprimentos aplicada ao setor de serviços de alimentação.** Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) – Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Engenharia de Produção, São Paulo.
- CREED P G., GHAZALA S. (ed.) (1998). Sous Vide and Cook Chill Processing for the Food Industry. Gaithersburg, MD., USA: Aspen Publishers Inc., ISBN 07514-0433-0/ 978-07514-0433-3, pp. 57-88.
- DAVIDSON P M., ROTH L A., Gambrel-Lenarz S A. (2004). Chapter 7 Coliform and Other Indicator Bacteria. In J. Bruhn (Ed.), Standard Methods for the Examination of Dairy Products. American Public Health Association. <https://doi.org/10.2105/9780875530024ch07>.
- DA CUNHA D T., STEDEFELDT E., ROSSO V V. (2014). The role of theoretical food safety training on Brazilian food handlers’ knowledge, attitude and practice. Food Control. 43: 167–174.
- DÍAZ P., GARRIDO M D., BAÑON S. (2010). The effects of packaging method (vacuum pouch VS. plastic tray) on spoilage in a cook-chill pork-based dish kept under refrigeration. Meat Science 84 (3): 538–544.
- DUAN Z., HANSEN T H., HANSEN T B., DALGAARD P., KNØCHEL S (2016). Predicting outgrowth and inactivation of *Clostridium perfringens* in meat products during low temperature long time heat treatment. International Journal of Food Microbiology 23: 45–57.
- DURAND R., RAO H., MONIN P. (2007). Code and conduct in French cuisine: Impact of code changes on external evaluations. Strategic Management Journal 28 (5):455–472.
- ELIAS S DE O. (2014). **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.** Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Microbiologia de Alimentos, Porto Alegre.

- ELBEHIRY A., MARZOUK E., HAMADA M., AI-DUBAIB M., ALYAMANI E., MOUSSA I M., *et al.*, (2017). Application of MALDI-TOF MS fingerprinting as a quick tool for identification and clustering of foodborne pathogens isolated from food products Ayman. *The New Microbiologica*. 40 (3).
- FAUCHART E., VON HIPPEL E. (2008). Norms-Based Intellectual Property Systems: The Case of French Chefs. *Organization Science*.19 (2): 187–201.
- FERGUSON P P. (1998). A Cultural Field in the Making: Gastronomy in 19th. Century France. *American Journal of Sociology*. 104 (3): 597–641.
- FERRER J., PRATS C., LÓPEZ D., VIVES-REGO J. (2009). Mathematical modelling methodologies in predictive food microbiology: a SWOT analysis. *International Journal of Food Microbiology*. (134):2-8.
- FORMIGONI I. (2017a). Maiores rebanhos e produtores de carne bovina no mundo. Disponível em: <http://www.farmnews.com.br/analises-mercado/produtores-de-carne-bovina/>. Acesso em: 2 setembro 2019.
- FORMIGONI I. (2017b). Qual o consumo de carne bovina por país? Disponível em: <http://www.farmnews.com.br/pesquisa-e-desenvolvimento/consumo-de-carne-bovina-4/>. Acesso: 2 setembro 2019.
- SYTHE S J. (Eds). 2013. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 607 p.
- FREIXA D., CHAVES G. (2015). *Gastronomia no Brasil e no Mundo* (3a.). Rio de Janeiro: Senac Editoras.
- GARCÍA-LINARES M C., GONZALEZ-FANDOS E., GARCÍA-FERNANDEZ M C., GARCÍA-ARIAS M T. (2004). Microbiological and nutritional quality of sous videor traditionally processed fish: influence off at content. *Journal of Food Quality*. 27: 371–387.
- GEERAERD A H., HERREMANS C H., VAN IMPE J F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 59 (3): 185–209.
- GEERAERD A H., VALDRAMIDIS V P., VAN IMPE J F. (2005). GlnaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*. 102(1): 95–105.
- GÓMEZ-ALDAPA C A., SEGOVIA-CRUZ J A., CERNA-CORTES J F., RANGEL-VARGAS E., SALAS-RANGEL L P., GUTIERREZ-ALCANTARA E J., *et al.*, (2016). Prevalence and behavior of multidrug-resistant shiga toxin-producing *Escherichia*

coli, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli* on coriander. Food Microbiology 59: 97-103.

GONZALES-BARRÓN U., PIZA L., XAVIER C., COSTA E., CADAVEZ V. (2014). An exposure assessment model of the prevalence of *Salmonella spp.* along the processing stages of Brazilian beef. Food Science and Technology International 22 (1):10–20.

GUNVIG A., JACOBSEN T., TØRNGREN M A (2012). How to make safe, juicy and rose beef patties for the food service sector. International Congress of Meat Science and Technology 12-17.

HABERBECK L U. (2011). **Modelagem da inativação isotérmica e não isotérmica de *Bacillus coagulans* por tratamento termoquímico utilizando óleo essencial de orégano.** Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) -Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Florianópolis.

HANSEN T B., KØCHEL S., JUNCHER D., BERTELSEN G. (1995). Storage characteristics of sous vide cooked roast beef. International Journal of Food Science & Technology 30: 365–378.

HATHERWAY C L. (1998). *Clostridium botulinum* and other clostridia that produce botulinum neurotoxin. In: Hauschild, A. & Dodds, K. L. (Eds). 1998. *Clostridium botulinum: Ecology and control in foods*. New York: Marcel Dekker Inc. 8 p.

HERNANDEZ E D., SALASEVICIENE A., ERTBJERG P. (2018). Low-temperature long-time cooking of meat: Eating quality and underlying Mechanisms. Meat Science 143:104-113.

HILGARTH M., BEHR J., VOGEL R F. (2017). Monitoring of spoilage-associated microbiota on modified atmosphere packaged beef and differentiation of psychrophilic and psychrotrophic strains. Journal of Applied Microbiology 124: 740-753.

HUFFMAN R D. (2002). Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. Meat Science 62(3): 285–94.

IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008 - 2009; Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>>. Acesso em: 02 abril. 2018.

ICMSF. (2015). International Commission on Microbiological Specifications for Foods -

Microrganismos em Alimentos 8: utilização de dados para avaliação do controle do processo e aceitação de produto. Tradução de Bernadete D.G. M. Franco *et al.* São Paulo: Blucher.536 p.

ITAL. (2010). Brasil food trends 2020. Instituto de Tecnologia de Alimentos. p. 171,

JAY J M. (Eds). 2005. **Microbiologia de Alimentos**. 711 p.

JASSON V., JACXSENS L., LUNING P., RAJKOVIC A., UYTTENDAELE M. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology* 27(6): 710–730.

JEONG K., HYONBIN O., SHIN S Y., KIM Y S. (2018). Effects of sous-vide method at different temperatures, times and vacuum degrees on the quality, structural, and microbiological properties of pork ham. *Meat Science* 143: 1-7.

JUNEJA V K., WHITING R C., MARKS H M., SNYDER O P.(1999). Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* at temperatures applicable to cooling of cooked meat. *Food Microbiology* 16: 335–349.

KAJAK K., KOLOZYN-KRAJEWSKA D. (2006). Construction of predictive models of growth of microorganisms in salted and cured meat products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 7 (1–2): 152–159.

KARYOTIS D., SKANDAMIS P N., JUNEJA V K. (2017). Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* in sous-vide processed marinated chicken breast. *Food Research International* (17): 30417-9.

KORKEALA H., BJLRKROTH K J. (1997). Spoilage and contamination of vacuum packaged cooked sausages: A review. *Journal of Food Protection* 60 (6): 724–731.

KUMAR P., RAO J., HARIBABU Y., MANJUNATH. (2014). Microbiological Quality of Meat Collected from Municipal Slaughter Houses and Retail Meat Shops from Hyderabad Karnataka Region, India. *APCBEE Procedia* 8: 364–369.

LAHOU E., WANG X., DE BOECK E., VERGULDT E., GEERAERD A., DEVLIEGHERE F., *et al.* (2015). Effectiveness of inactivation of foodborne pathogens during simulated home pan frying of steak, hamburger or meat strips. *International Journal of Food Microbiology* 206: 118–129.

LAVIGNE J P., ESPINAL P., DUNYACH-REMY C., MESSAD N., PANTEL A., SOTTO A. (2013). Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology?. *Clin Chem Lab Med* 51(2):257–70.

LEVINE K., CHAIFETZ A., CHAPMAN B. (2017). Evaluating food safety risk messages

- in popular cookbooks. *British Food Journal* 119 (5): 1116-1129.
- LIU H., WAHL T., SEALE J., BAI J. (2015). Household composition, income, and food-away-from-home expenditure in urban China. *Food Policy* 51: 97–103.
- MAPA., ABREU SK. (2010). O Agronegócio e o Sucesso do Brasil no Mercado de Carnes. In FAMASUL (p.15). Brasília. Disponível em: <http://www.famasul.com.br/palestrascongresso/css/images/SenadoraKatiaAbreu.pdf>. Acesso em: 22 setembro 2019.
- MAPA - Ministério da agricultura, pecuárias e abastecimento. (2018). Produção de carne no Brasil. Brasília. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal>>. Acesso em: 31 de maio 2018.
- MARESCA P., FERRARI G. (2017). Modeling of the microbial inactivation by high hydrostatic pressure freezing. *Food Control* 73: 8–17.
- MARIO DI RENIGIO (Eds). 1997. **Sotto Vuoto e atmosfera modificata, principi nozioni ricette tecnica**. Viale Genova. 67 p.
- MARKS B P. (2008). Status of Microbial Modeling in Food Process Models. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7 (1): 137–143.
- MCDONALD K., SUN D W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 52: 1–27.
- MCMEEKIN T A., OLLEY J., RATKOWSKY D A., ROSS T. (2002). Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology* 73 (2–3): 395–407.
- MEAD P S., SLUTSKER L., DIETZ V., MCCAIG L F., BRESEE J S., SHAPIRO C., *et al.*, (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5 (5): 607 – 625.
- MESQUITA M., VALENTE T., ZIMMERMANN A., FRIES L., TERRA N. (2014). Qualidade físico-química da carne bovina in natura aprovada na recepção de restaurante industrial. *Vigilância Sanitária Em Debate* 2 (3): 103–108.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção. (2019). Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>. Acesso em: 25 agosto 2019.
- MORAES F. (2016). **Sous vide carne bovina (músculo semitendinosus): Efeitos das condições de processamento e comparação com os sistemas Cook Chill e convencional**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade

Estadual de Campinas.

- MOTTRAM D S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chemistry* 62 (4):415–424.
- NAGORNY A S., ALESHUKINA A V., ALESHUKINA I S., ERMAKOVA L A., PSHENICHNAYA N Y. (2019). The application of proteomic methods (MALDI-toff MS) for studying protein profiles of some nematodes (dirofilaria and ascaris) for differentiating species. *International Journal of Infectious Diseases* 82: 61–65.
- NARENDRANATH N V., HYNES S H., THOMAS K C., INGLEDEW W M. (1997). Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (11):4158-416.
- NG T W., LI B., CHOW A., WONG P K. (2016). Effects of bromide on inactivation efficacy and disinfection byproduct formation in photocatalytic inactivation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 324: 145–151.
- NYATI H. 2000 b. An evaluation of the effect of storage and processing temperatures on the microbiological status of sous vide extended shelf-life products. *Food Control* 11(6): 471– 476.
- OECD-FAO. (2017). OECD-FAO Agricultural Outlook 2007-2016 ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Paris. Disponível em: <https://www.oecd.org/tad/agricultural-trade/38893266.pdf>. Acesso em: 22 setembro 2019.
- OLIVEIRA A P D., SILVA C., REZENDE M., SOLA M C., FEISTEL J C., OLIVEIRA J J D. (2013). Microbiologia Preditiva. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer* 9 (17): 1909–1928.
- OLIVEIRA T C ., SILVA D A. (Eds). 2016. **Administração de unidades produtoras de refeições. Desafios e perspectivas**. 201 p.
- OTTENBACHER M., HARRINGTON R J. (2007). The innovation development process of Michelin-starred chefs. *International Journal of Contemporary Hospitality Management* 19 (6): 444–460.
- PAVLOVIC M., HUBER I., KONRAD R., BUSCH U. (2013). Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. *The Open Microbiology Journal* 7: 35–41.
- PASTERNAK J. (2012). New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. *Avanços Médicos - Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo* 1: 118-9.

- PEIXOTO C R., ARMEDARIS P., GRASSE A., HENGLES F A W., TONDO E C. (2019). *Escherichia coli* inactivation on tenderloin beef medallions fried to diferente degrees of doneness. Food Control 106: 106683.
- PINHEIRO N., SARTORI G V., RIBEIRO A B. (2006). Controle de Qualidade Microbiológico na Cadeia de Abate de Bovinos. SaBios-Revista de Saúde E Biologia 11(1): 1–11.
- POPOVA T., MARINOVA P., VESELKA V., GORINOV Y., LIDJI K. (2009). Oxidative changes in lipids and proteins in beef during storage. Archiva Zootechnica 12 (3):30-38.
- RODGERS S. (2007). Innovation in food service technology and its strategic role. International Journal of Hospitality Management 26 (4): 899–912.
- ROSS T., MCMEEKIN T A. (2003). Modeling microbial growth within food safety risk assessments. Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis 23 (1):179–97.
- RUIZ J. (2010). Cocina al vacío y a temperaturas controlada. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular 166: 11-14.
- RYBKA-RODGERS S. (1999). Developing a HACCP plan for extended shelf- life cook-chill ready-to-eat meals. Food Australia 51: 430–433.
- SÃO PAULO. 2013. Secretaria de Estado da Saúde. Portaria - CVS nº 5, de 09/04/2013. Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação. Diário Oficial do Estado de São Paulo. 29 p.
- SCHELLEKENS W., MARTENS T. (1992). Sous vide: State of the art (Publication EUR 15018 EN). Leuven, Belgium: Alma Sous Vide Competence Centre.
- SHEARD M A., RODGER C. (1995). Optimum heat treatments for sous vide cook-chill products. Food control 6 (1):53-56.
- SILVA E C. (2010). **Importância do controle microbiológico para a qualidade de carne bovina: Revisão bibliográfica**. Trabalho de conclusão de curso - Faculdades Integradas FAFIBE Ciências Biológicas.
- SILVA J B D., PRAZERES A R D., OLIVEIRA A C., DANTAS V V D S., BARROS M C D S. (2016b). Avaliação higienico-sanitaria de estabelecimentos comerciais e análise de micro-organismos indicadores em amostras de carne bovina (coxo mole) in natura comercializadas em mercados publicos. 0 Revista Do Instituto

Adolfo Lutz 75: 01–07.

- SILVA D C., FARIA P B., PEREIRA A A., DUARTE W F., NOGUEIRA T M. (2016). Parâmetros microbiológicos em diferentes cortes de carne bovina resfriada. *Higiene Alimentar*. 30(260/261): 116–120.
- STEA T H., JOHANSSON M., JAGERSTAD M., FROLICH W. (2006). Retention of folates in cooked, stored and reheated peas, broccoli and potatoes for use in modern large-scale service systems. *Food Chemistry* 101 (3): 1095-1107.
- SUN S., SULLIVAN G., STRATTON J., BOWER C., CAVENDER G. (2017). Effect of HPP treatment on the safety and quality of beef steak intended for sous vide cooking. *LWT - Food Science and Technology* 86:185-192.
- SVEJENOVA S., MAZZA C., PLANELLAS M. (2007). Cooking up change in haute cuisine: Ferran Adrià as an institutional entrepreneur. *Journal of Organizational Behavior* 28 (5): 539–561.
- THEPAREE T., DAS S., THOMSON R B. (2018). Total laboratory automation and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry improve turnaround times in the clinical microbiology laboratory: a retrospective analysis. *J Clin Microbiol* 56: 01242-17.
- TONDO E C., BARTZ S. (Eds). 2014. *Microbiologia e sistemas de gestão da segurança dos alimentos*. 263 p.
- USDA-ERS. (2016). *Cost Estimates of Foodborne Illnesses*. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illnesses/>>. Acesso em: 12 jul. 2017.
- VÁSQUEZ-GARCÍA A., OLIVEIRA A P S C., MEJIA-BALLESTEROSC J E., GODOYA S H S., BARBIERID E., SOUSA R L M., *et al.*, (2019). *Escherichia coli* detection and identification in shellfish from southeastern Brazil. *Aquaculture* 504: 158–163.
- VAUDAGNA S R., SÁNCHEZ G., NEIRA M S., INSANI E M., PICALLO A B., GALLINGER M M., *et al.*, (2002). Sous vide cooked beef muscles: effects of low temperature-long time (LT-LT) treatments in their quality characteristics and storage stability. *International Journal of Food Science & Technology* 37 (4): 425-441.
- ZANONI C R. (2012). *O mercado de gastronomia de São Paulo: Maximização de valor na gastronomia: O caso de restaurantes de alto padrão em São Paulo*. Fundação Getúlio Vargas.

- YANG X., WANG H., HE A., TRAN F. (2017). Microbial efficacy and impact on the population of *Escherichia coli* of a routine sanitation process for the fabrication facility of a beef packing plant. *Food Control* 71: 353–357.
- WANG Y., CHENG Z., LU X., TANG C. (2009). *Echinococcus multilocularis*: proteomic analysis of the protoscoleces by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Exp Parasitol* 123(2):162–7.
- WANG S H., CHANG M H., CHEN T C. (2004). Shelf-life and microbiological profiler of chicken wing products following sous vide treatment. *International Journal of Poultry Science* 3 (5):326–332.
- WANG X., UYTENDAELE M., GEERAERD A., STEEN L., FRAEYE I., DEVLIEGHIERE F. (2016). Thermal inactivation kinetics of surface contaminating *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged agar surface and ready-to-eat sliced ham and sausage. *Food Research International* 89: 843–849.
- WELKER C A D., BOTH J M C., LONGARAY S M., HASS S., SOEIRO M L T., RAMOS R C. (2010). Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 8 (1): 44–48.
- WHITING R C., BUCHANAN R L. (1994). Microbial Modeling. A scientific status summary by the Institute of Food Technologists. *Food Technology* 48 (6): 113–120.
- WHITING R C. (1995). Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35 (6):467–494.
- WHO- Food and agriculture world health organization of the united nations. *Codex Alimentarius*. (1993). Code of hygienic practice for precooked and cooked in mass catering.
- WHO. (2006). Five keys safer food manual. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43546/1/9789241594639_eng.pdf>. Acesso em: 18 junho 2018.
- WHO. (2019). WHO - Food safety. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>>. Acesso em: 22 setembro 2019.
- WHO. (2015a). WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths. WHO. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease->

estimates/en/. Acesso em 25 de agosto de 2019.

WHO. (2015b). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Geneva: WHO Press.

Disponível em:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf?ua=1.

Acesso em 25 de agosto de 2019.

WU Y., LIU X., CHEN Q., LIU H., DAI Y., ZHOU Y., eta al., (2018). Surveillance for foodborne disease outbreaks in China, 2003 to 2008. Food Control 84: 382-388.

XIAO S., ZHANG W G., LEE E J., MA C W., AHN D U. (2011). Effects of diet, package and irradiation on protein oxidation, lipid oxidation, and color of raw broiler thigh meat during refrigerated storage. Poultry Science 90 (6):1348-1357.