



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

VALDENICE GOMES DE ARAÚJO

**ESTUDO PREDITIVO DA SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS
PATOGENICAS EM QUEIJO DE COALHO**

JOÃO PESSOA – PB

2016

VALDENICE GOMES DE ARAÚJO

**ESTUDO PREDITIVO DA SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS
PATOGENICAS EM QUEIJO DE COALHO**

JOÃO PESSOA – PB

2016

A663e

Araújo, Valdenice Gomes de.

Estudo preditivo da sobrevivência e crescimento de bactérias patogênicas em queijo de coalho / Valdenice Gomes de Araújo.- João Pessoa, 2016.

76f. : il.

Orientador: Evandro Leite de Souza

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS

1. Nutrição. 2. Análise e controle - qualidade - alimentos.
3. Queijo não maturado. 4. Crescimento bacteriano. 5. Modelos preditivos. 6. Risco microbiano.

UFPB/BC

CDU: 612.39(043)

VALDENICE GOMES DE ARAÚJO

**ESTUDO PREDITIVO DA SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS
PATOGENICAS EM QUEIJO DE COALHO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Área de concentração: Ciências da Nutrição
Linha de Pesquisa: Análise e Controle de Qualidade de Alimentos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

**JOÃO PESSOA – PB
2016**

VALDENICE GOMES DE ARAÚJO

**ESTUDO PREDITIVO DA SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS
PATOGENICAS EM QUEIJO DE COALHO**

Dissertação aprovada em 20/06/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Evandro Leite de Souza – DN/CCS/UFPB

Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Pinheiro de Toledo Vianna – DN-CCS-UFPB

Examinador Interno

Prof. Dr^a. Maria Elieidy Gomes de Oliveira – VAS – CES – UFCG – Campus de Cuité

Examinador Externo

Prof. Dr. Lúcia Raquel Ramos Berger – PPGCN-UFPB

Examinador Suplente Interno

Prof. Dr. Carlos Eduardo Vasconcelos de Oliveira – DN-CCS-UFPB

Examinador Suplente Externo

A Deus, por todas as vitórias alcançadas. E por tudo que faz na minha vida. Aos meus pais, Waldomiro e Ivete (*in memorian*), pelo exemplo de amor, dedicação, respeito, força e fé.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido a vida, por seu Misericordioso amor por mim, por ter me concedido forças e coragem para enfrentar todos os momentos difíceis, por ter aumentado as horas do dia para executar todas as tarefas e responsabilidades que me disponibilizei a fazer. A Ti Senhor louvo e agradeço em verdade, quando precisei de Ti estavas lá para me guiar.

A Universidade Federal da Paraíba, em especial ao Programa de Pós - Graduação em Ciências da Nutrição, na pessoa de todos os Mestres e Doutores, ao administrativo que tanto nos auxilia em tudo, obrigada.

Ao Professor, Dr. Evandro Leite de Souza, por todo apoio dispensado, pelas orientações para conclusão deste trabalho, pelo exemplo de profissional e pela confiança.

A Professora Dr^a. Maria Lúcia da Conceição, pela gentileza, e por todas as orientações na bancada do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Centro de Ciências da Saúde (CCS) UFPB.

A Professora Dr^a. Rita de Cássia Queiroga, por todo apoio concedido, pela liberação e uso do laboratório para realização das análises físico-químicas. A todos do Laboratório de Bromatologia (CCS – UFPB).

A Mestranda Maria Digian Arruda, por todos os ensinamentos, amizade, dedicação, por tudo que me ensinou.

A Estagiária de Pós-Doutorado, Janaína Maria Batista de Sousa, pela grandiosa ajuda na realização e conclusão deste trabalho, por todo tempo dispensado para cumprir as análises. Obrigada por sua meiguice, gentileza e amizade.

A todos(as) Mestrandas(os), Doutorandas(os), aos alunos da Iniciação Científica, que sempre ajudou desde o início do projeto. Em especial a Kataryne Árabe, a Nelson Justino e a Jossana.

Ao meu Pai, Waldomiro Gomes de Araújo, por ter me ensinado a sempre construir um caminho digno, de verdade, e lutar por meus objetivos e, assim, poder concretizá-los.

A minha querida e amada Mãe, Ivete Gomes de Araújo, por todo amor, carinho, por ter me deixado a maior herança que foram as suas orientações, pois muito do que sou hoje foi a Senhora quem construiu. Sei que estás ao lado de Deus nosso Pai, e que nunca deixou de me orientar para o caminho do bem.

A minha irmã, Valéria Gomes de Araújo, por todo apoio dado, amor, carinho, força para continuar, sempre me apoiando e tranquilizando, me ajudando incondicionalmente em tudo e em todas as tarefas, seu apoio foi fundamental para concluir esse mestrado.

A Diretora Djanira Lucena, da Agência Estadual de Vigilância Sanitária, pela compreensão e concessão de horário para continuar a estudar.

A todos que não citei diretamente aqui, mas que me ajudaram nessa caminhada, de alguma forma, cooperaram para esse trabalho e desejaram meu sucesso.

Obrigada.

"Eu aprendi que todos querem viver no topo da montanha,
mas toda felicidade e crescimento ocorre quando você está escalando-a". (W. Shakeaspeare)

RESUMO

Os queijos de baixa maturação, categoria que inclui o queijo de coalho, possuem características físico-químicas que podem facilitar a sobrevivência e crescimento de bactérias patogênicas associadas a surtos de doenças transmitidas por alimentos. O emprego de modelos matemáticos na microbiologia preditiva permite estimar o efeito das condições bióticas e abióticas sobre o crescimento microbiano, e, conseqüentemente, o possível risco associado à presença e evolução da população de um patógeno em um alimento determinado. Considerando estes aspectos, o presente estudo teve como objetivos: (i) avaliar o queijo de coalho como substrato potencial para o crescimento das bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. em função de valores de temperatura, pH e atividade de água (a_a) encontrados em amostras comerciais deste tipo de produto; e (ii) realizar modelagem primária do crescimento de diferentes cepas de *E. coli* em amostras de queijo de coalho armazenadas sob baixa temperatura. As estimativas dos parâmetros de cinética de crescimento (taxa máxima de crescimento – Grmax, log UFC/g/) em função da combinação dos valores (Percentil 20, 50, 75 e 90) de temperatura, pH e a_a foram geradas pelo ComBase Predictor. A cinética de crescimento das cepas de *E. coli* em queijo de coalho (10 °C) foi avaliada por meio do Grmax utilizando o modelo primário de Baranyi e Roberts (1994), disponível na planilha do DMFit 3.5 (ComBase). Os maiores valores de Grmax em função das diferentes combinações de temperatura, pH e a_a foram verificados para *L. monocytogenes* (Grmax 0,01 – 0,07 log UFC/g/h), *Salmonella* spp. (Grmax 0,01 – 0,04 log UFC/g/h) e *S. aureus* (Grmax 0,01 – 0,05 log UFC/g/h). Os valores de Grmax para *E. coli* variaram de 0,01 a 0,02 log UFC/g/h. De forma geral, os valores de Grmax aumentaram, proporcionalmente a temperatura nas amostras de queijo, a despeito dos valores de a_a e pH. Os valores estimados de Grmax das cepas de *E. coli* quando inoculadas em queijo de coalho variaram de 0,01 a 0,03 log UFC/g/h. Foram obtidos elevados valores de R^2 ($\geq 0,97$) para as curvas de crescimento de todas as cepas de *E. coli* testadas. As estimativas dos parâmetros de cinética de crescimento em função dos valores de temperatura, a_a e pH testados, bem como àqueles verificados em amostras artificialmente contaminadas, mostram que o queijo de coalho se caracteriza como substrato favorável para a sobrevivência e crescimento de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *S. aureus*, podendo representar um risco a saúde aos consumidores caso seja contaminado com estas bactérias durante a sua produção, transporte ou comercialização.

Palavras-chave: queijo não maturado, crescimento bacteriano, modelos preditivos, risco microbiano.

ABSTRACT

Minimally ripened cheeses, a category that includes the coalho cheese, have physicochemical characteristics that facilitate the survival and growth of pathogenic bacteria associated with foodborne illness outbreaks. Use of mathematical models in the predictive microbiology allows to estimate the effect of biotic and abiotic conditions on microbial growth, and hence the possible risk associated with the presence and increase of the population of a specific pathogen in a particular food. Considering these aspects, the present study aimed to: (i) assess the coalho cheese as a potential substrate for the growth of the pathogenic bacteria *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in function of temperature, pH and water activity (a_w) found in commercial samples of this type of product; and (ii) performing primary modeling growth of different strains of *E. coli* in coalho cheese samples stored under low temperature. The estimates of the growth kinetics parameter (maximum growth rate - G_{max} , log UFC/g/h) in function of the combination of the values (percentile 20, 50, 75 and 90) for temperature, pH and a_w were generated by ComBase *Predictor*. The growth kinetics (G_{max}) of *E. coli* strains in coalho cheese (10 °C) was assessed by using the primary model of Baranyi and Roberts (1994), available in spreadsheet DMFit 3.5 (ComBase). The largest G_{max} values as a function of different combinations of temperature, pH and a_w were observed for *L. monocytogenes* (G_{max} 0.01 to 0.07 log CFU/g/h), *Salmonella* (G_{max} 0.01 to 0.04 log CFU/g/h) and *S. aureus* (G_{max} <0.01 to 0.05 log CFU/g/h). *E. coli* G_{max} values varied from 0.01 to 0.03 log CFU/g/h. Overall, the G_{max} values increased as the temperature increased in cheese samples, regardless of the a_w and pH values. The estimated G_{max} values for the *E. coli* strains when inoculated into coalho cheese ranged from 0.01 to 0.03 log CFU/g/h, respectively. High R^2 values (≥ 0.97) were obtained to the growth curves of all *E. coli* strains tested. The estimates of the growth kinetics parameters in function of the values of temperature, a_w and pH tested, as well as those observed in artificially contaminated cheese samples showed that the coalho cheese is characterized as favorable substrate for the survival and growth of *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus*, which may pose a risk to consumers' health if contaminated with these bacteria during production, transportation or marketing.

Keywords: minimally ripened cheese, bacterial growth, predictive models, microbial risk.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1. Série histórica de surtos e casos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil de 2000 a 2015**. Dados sujeitos a alteração. *Última atualização em outubro de 2015. FONTE: SINAN/SVS/Ministério da Saúde.....	22
FIGURA 2. Distribuição dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil de 2000 a 2015. Última atualização em outubro de 2015. FONTE: Adaptado do SINAN/SVS/Ministério da Saúde.....	23
FIGURA 3. Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil de 2000 a 2015. Última atualização em outubro de 2015. FONTE: Adaptado do SINAN/SVS/Ministério da Saúde.....	23
FIGURA 4. Descrição gráfica das fases do crescimento microbiano e dos parâmetros de cinética de crescimento relacionados (ANJOS, 2013).....	29

LISTA DE QUADROS

REVISÃO DA LITERATURA

QUADRO 1. Bactérias potencialmente patogênicas detectadas como contaminantes em amostras comerciais de queijo de coalho.....	24
---	----

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

Figure 1. The predicted growth models of <i>E. coli</i> (— · — · —), <i>L. monocytogenes</i> (——), <i>Salmonella</i> spp. (---) and <i>S. aureus</i> (.....) under different conditions of temperature, pH and a_w (A): 8.5 °C, pH 5.9 and a_w 0.95 for <i>L. monocytogenes</i> and <i>S. aureus</i> ; 8.5 °C, pH 5.9 and a_w 0.97 for <i>Salmonella</i> spp.; and 10 °C, pH 5.9 and a_w 0.96 for <i>E. coli</i> ; (B): 8.5 °C, pH 6.77 and a_w 0.96 for <i>L. monocytogenes</i> and <i>S. aureus</i> ; 8.5 °C, pH 6.77 and a_w 0.97 for <i>Salmonella</i> spp.; and 10 °C, pH 6.77 and a_w 0.96 for <i>E. coli</i> (C): 8.5 °C, pH 6.39 and a_w 0.95 for <i>L. monocytogenes</i> and <i>S. aureus</i> ; 8.5 °C, pH 6.39 and a_w 0.97 for <i>Salmonella</i> spp.; and 10 °C, pH 6.39 and a_w 0.96 for <i>E. coli</i> . The predictions were obtained using ComBase models (http://modelling.combase.cc/).....	75
---	----

Figure 2. The predicted growth models of *E. coli* (---), *L. monocytogenes* (—), *Salmonella* spp. (- - - -) and *S. aureus* (.....) under different conditions of temperature, pH and a_w . (A): 13.6 °C, pH 5.9 and a_w 0.96 for *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*, and 13.6 °C, pH 5.9 and a_w 0.97 for *Salmonella* spp.; (B): 13.6 °C, pH 6.06 and a_w 0.96 for *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*, and 13.6 °C, pH 6.06 and a_w 0.97 for *Salmonella* spp.; and (C): 13.6 °C, pH 6.39 and a_w 0.96 for *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*, and 13.6 °C, pH 6.39 and a_w 0.97 for *Salmonella* spp. The predictions were obtained using ComBase models (<http://modelling.combase.cc/>)..... 76

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1. The percentile and maximum and minimum values of temperature, pH and water activity (a_w) determined in commercial coalho cheese samples (n = 100)..... 70

Table 2. The predicted maximum growth rate - Grmax (log CFU/g/h) of *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus* in coalho cheese under different combinations of temperature, pH and a_w (percentile 25, 50, 75 and 90, and minimum and maximum values) determined in commercial coalho cheese samples. The predictions were obtained using ComBase Predictor – static growth models (<http://modelling.combase.cc/>)..... 71

Table 3. Predicted maximum growth rate (Grmax) and latency time (λ) of different *E. coli* strains in coalho cheese stored at 10 ± 0.5 °C..... 74

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 QUEIJO DE COALHO	17
2.1.1. Parâmetros de identidade e qualidade	17
2.1.2 Parâmetros físico-químicos influenciadores do crescimento microbiano.....	18
2.1.3 <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Salmonella</i> spp. como patógenos alimentares.....	21
2.1.4 Abordagem preditiva no estudo da sobrevivência e crescimento microbiano em alimentos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 AMOSTRAS DE QUEIJO DE COALHO	34
3.2 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA, pH, a_w , DAS AMOSTRAS DE QUEIJO DE COALHO.....	34
3.3 PROCESAMENTO DOS DADOS E PREVISÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DO CRESCIMENTO BACTERIANO	34
3.4 MODELAGEM DO CRESCIMENTO <i>E. coli</i> EM QUEIJO DE COALHO	35
3.4.1 Cepas bacterianas e preparo do inóculo	35
3.4.2 Preparação de amostras de queijo de coalho, procedimento de incubação e avaliação do crescimento das variantes de <i>E. coli</i>	36
3.4.3 Modelagem dos dados	37
3.4.4. Análise estatística	37
REFERÊNCIAS	38
APÊNDICE	50
ARTIGO	51

1. INTRODUÇÃO

A garantia da segurança microbiológica é reconhecida como aspecto de fundamental importância para a produção e comercialização de alimentos. As características microbiológicas dos alimentos constituem motivo de preocupação e monitoramento constante em todo o mundo e estão diretamente relacionadas às condições higiênico-sanitárias adotadas durante as etapas de fabricação, armazenamento, transporte e comercialização. Alimentos que não são seguros sob o ponto de vista microbiológico são reconhecidos como um problema contínuo de saúde pública em diversos países (CDC, 2013).

Os queijos frescos e de baixa maturação, onde se inclui o queijo de coalho, são considerados substratos potencialmente favoráveis à sobrevivência e multiplicação de micro-organismos patogênicos, principalmente por serem matrizes que apresentam elevado teor de umidade e de proteínas, além de pH menos ácido quando comparado aos queijos maturados (FEITOSA et al., 2003). A literatura tem revelado elevado consumo de queijo de coalho em cidades localizadas na região Nordeste do Brasil, de modo que percentuais elevados da população se declaram consumidores regulares do produto (MENDES et al., 2002; MEDEIROS JUNIOR, 2011). Também diversos estudos detectaram elevadas contagens ou a presença de bactérias potencialmente patogênicas em amostras de queijo de coalho comercializadas na região Nordeste, incluindo *Escherichia coli*, *Listeria spp.*, *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* (FLORENTINO MARTINS, 1999; MENDES et al., 1999; LEE et al., 2009; SOLOMAKOS et al., 2009; BROOKS et al., 2012.; MAFFEI et al., 2013). Tais observações estão em acordo com outros relatos que apontam que considerável parte da produção de queijo de coalho ocorre sem a adoção de práticas higiênico-sanitárias adequadas (NASSU, 2000; SANTANA et al., 2008; BORGES et al., 2008; MONTANHINI et al., 2013). De forma geral, estes dados tipificam o queijo de coalho como um produto que normalmente apresenta elevados níveis de contaminação microbiana, caracterizando-o como de potencial risco aos consumidores.

A capacidade de sobrevivência e o crescimento de micro-organismos patogênicos em alimentos dependem de fatores intrínsecos (ex., composição de nutrientes, pH e atividade de água) e extrínsecos (ex., temperatura). Esses fatores influenciam a sobrevivência e o padrão de crescimento de micro-organismos nas condições particulares encontradas em diferentes alimentos. Ao mesmo tempo, proporcionam conhecer a perecibilidade destes produtos e auxiliam na determinação de sua vida de prateleira (FDA, 2016).

Os parâmetros preditivos relacionados ao comportamento microbiano tais como, a velocidade específica máxima de crescimento, o tempo de geração e o tempo de duração da fase lag, ou período de latência, permitem estimar a influência de fatores intrínsecos e dos fatores extrínsecos, e da sua interação, sobre o crescimento de um micro-organismo ou grupo de micro-organismo em dada condição experimental ou matriz alimentar (RODRÍGUEZ et al., 2013). Ao avaliar a influência de diferentes variáveis, tais como: pH, cloretos (NaCl), atividade de água (a_a), tempo e temperatura de armazenamento, é possível estimar a magnitude do aumento ou diminuição de uma dada população microbiana nas condições testadas, bem como o tempo necessário para que tal população possa alcançar um nível suficiente para representar uma ameaça à saúde dos consumidores (SOBOLEVA et al., 2000; DANNENHAUER, 2010).

Apesar do conhecimento da ampla produção e consumo de queijo de coalho na região Nordeste do Brasil, e de uma recorrente ocorrência de contaminação deste produto por diferentes tipos de micro-organismos patogênicos, até o momento não existem estudos com abordagem voltada para a avaliação da sobrevivência e crescimento de bactérias patogênicas em queijo de coalho e, conseqüentemente, dos seus potenciais riscos à saúde do consumidor. É interessante citar que alguns estudos com abordagem preditiva do comportamento microbiano em diferentes produtos lácteos podem ser encontrados, incluindo os efeitos da temperatura, pH e atividade de água sobre o crescimento de *Mucor* spp. em queijos (MORIN-SARDIN et al., 2016), e a modelagem do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijos produzidos com leite cru ou pasteurizado (SCHVARTZMAN et al., 2011) e em queijo tipo Camembert (KOWALIK; LOBACZ, 2015). Ademais, estudos disponíveis no Brasil apresentam *Escherichia coli* como a bactéria potencialmente patogênica mais frequentemente detectada como contaminante de queijos nacionais (SILVA et al., 2010; MELO et al., 2013; MENESES et al., 2012; SILVA et al., 2012).

Assim, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo (i) de avaliar o queijo de coalho como substrato potencial para o crescimento das bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp., em função de valores representativos de temperatura, pH e atividade de água (a_a) encontrados em amostras comerciais deste tipo de produto; e (ii) de realizar uma modelagem primária do crescimento de diferentes cepas de *Escherichia coli* em queijo de coalho armazenado sob baixa temperatura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 QUEIJO DE COALHO

2.1.1 Parâmetros de identidade e qualidade

O queijo é considerado um alimento cuja produção veio possibilitar a conservação do leite, vindo a garantir-lhe o reconhecimento de ser um dos principais produtos agrícolas (CORREIA, 2011). Historicamente, a produção do queijo de coalho é uma atividade puramente artesanal, o que possibilita inserí-lo no *rol* de produtos que passaram a ser chamados “de artesanais”, “produtos da terra” ou “produtos com história” (TIBÉRIO, 1998). O queijo de coalho se destaca por compor um patrimônio rural-cultural do Brasil (BERARD; MARCHENAY, 1996) e se caracteriza por ser um queijo de massa branca, de formato retangular, com sabor levemente ácido e salgado.

A legislação sanitária do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) define queijo de coalho como “um produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou soro de lácteos, coagulados pela adição física do coalho, enzimas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes” (BRASIL, 1996).

Nesse sentido, o processamento e armazenamento do queijo de coalho devem ser realizados em atenção a Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001- Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) do Ministério da Agricultura, a qual estabelece a identidade e os requisitos para produzir este tipo de queijo. O queijo de coalho deve ser obtido por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes autorizadas, complementadas ou não pela ação de bactérias lácticas selecionadas, e comercializado normalmente com dez dias de fabricação (BRASIL, 2001a). Considera que o queijo de coalho deve apresentar consistência semi-dura, elástica, textura compacta e macia, podendo apresentar algumas olhaduras. A cor deve ser uniforme, branca amarelada, sabor brando, ligeiramente ácido e salgado, odor ligeiramente ácido, similar ao de coalhada fresca, casca fina e não bem definida (BRASIL, 2001a).

O regulamento estabelece também os requisitos físico-químicos para o produto, o qual deve apresentar entre média e alta umidade (36-54,9%); com massa semi-cozida ou cozida e teor de gordura e sólidos totais variáveis (35 - 60%) (BRASIL, 2001a). Estabelece, ainda, que

após o processo de elaboração do produto a massa do queijo deve passar por prensagem, secagem, embalagem e estocagem em temperatura de 10 °C, normalmente até dez dias, período que se refere à etapa de maturação (BRASIL, 2001a). Ainda, permite que o queijo de coalho possa ser elaborado a partir de massa crua (sem aquecimento). Este tipo de queijo deve ser acondicionado em embalagem bromatologicamente apta, com ou sem vácuo. Em relação às condições de conservação e comercialização, o queijo de coalho deverá manter-se a uma temperatura não superior a 12 °C (BRASIL, 2001b).

As condições gerais de processamento do produto devem seguir as práticas de higiene dispostas no Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos Portaria nº 368/97 – MA (BRASIL, 1997). Ao término do processo de elaboração, o queijo de coalho deve atender aos padrões microbiológicos previstos pela Resolução RDC 12/2001 (ANVISA), a qual determina tolerância máxima de 500 NMP/g de coliformes termotolerantes, 500 UFC/g de *Staphylococcus* coagulase-positiva e ausência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em 25 g do produto (BRASIL, 2001b). Em relação à pasteurização ou tratamento térmico equivalente do leite com principal matéria-prima, bem como aos critérios macroscópicos e microbiológicos, o produto deve atender as determinações do "Regulamento Técnico Geral para Fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijos" - Portaria nº 146/96 – Ministério da Agricultura (BRASIL, 1996).

2.1.2 Aspectos tecnológicos e físico-químicos influenciadores do crescimento microbiano

A produção do queijo de coalho ocorre restritamente à região Nordeste do Brasil, ficando concentrada, principalmente, nos Estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. No entanto, a legislação para o queijo de coalho é pouco definida no que trata das características físico-químicas do produto final, o que reflete em deficiências na sua identidade (NASSU, 2003).

A produção de queijo de coalho não conta com tecnologias apropriadas bem estabelecidas, necessitando aperfeiçoar seu processo com vistas na melhoria da qualidade do produto final, porém sem descaracterizá-lo, visto que, o produto obtido tradicionalmente possui grande popularidade e aceitação (LIMA, 1996). Entretanto, cabe ressaltar que, apesar de sua popularidade na Região Nordeste, o queijo de coalho produzido artesanalmente, muitas vezes, não atende aos requisitos de qualidade para ser destinado ao consumo humano (DUARTE et al., 2005; LIMA, 2010).

Obrigatoriamente, o leite utilizado na produção de queijos frescos deve ser submetido à pasteurização prévia. A qualidade do leite se constitui como um dos principais problemas para os produtores de queijo de coalho, pois apenas uma minoria dos estabelecimentos faz uso de leite pasteurizado como matéria-prima. Contudo, Cavalcanti et al. (2007) consideram que a pasteurização do leite consiste em uma estratégia inicial de garantir a segurança do produto. Porém, a legislação brasileira permite a fabricação de produtos derivados do leite cru, e estabelece que só após quarenta dias de maturação estes podem ser comercializados (PERRY, 2004).

O processo de fabricação do queijo compreende quatro etapas: 1. Coagulação do leite, realizada diretamente pela flora microbiana naturalmente presente no leite, ou pela adição de coalho ou cultivo bacteriano apropriado (fermento), quando o leite é então fermentado e transforma-se em uma coalhada; 2. Corte da coalhada: ocorre a liberação do lactosoro; 3. Prensagem da massa em formas, ou não, dependendo do queijo; e 4. Enformadura, salga e embalagem (OLIVEIRA, 2013).

Na etapa de coagulação do leite, em decorrência da adição do coalho, ocorre a ação da enzima renina (fosfoproteína de ação proteolítica), a qual hidrolisa as ligações peptídicas da caseína, transformando em *para*-caseína que precipita em presença de íons Ca^{2+} , obtendo-se a coalhada (PERRY, 2004; ORDÓÑEZ et al., 2005a). No processo de salga, o percentual de cloreto de sódio (NaCl) adicionado geralmente apresenta-se entre 0,5 - 2,0%, de modo que a diferença osmótica entre a salmoura e a massa faz com que parte da umidade seja liberada, juntamente com proteínas do soro, ácido láctico e minerais dissolvidos, ao mesmo tempo que o NaCl é absorvido pelo produto (PERRY, 2004; ORDÓÑEZ et al., 2005a).

Na maturação ocorrem vários processos físicos, bioquímicos e microbiológicos que alteram a composição química dos queijos. Esta etapa deve ser realizada em câmaras com controle de temperatura e umidade (PERRY, 2004; et al., 2005). Cavalcanti et al. (2007) relatam que o adequado uso de baixas temperaturas é importante para o controle do processo de maturação e para estender a vida de prateleira dos queijos. Os autores destacam que o não uso desse método de conservação ou o seu emprego inadequado favorece o aumento das atividades enzimáticas e microbianas, as quais ocorrem naturalmente com a elevação da temperatura de armazenamento.

O queijo de coalho pode ser considerado um alimento susceptível a contaminação de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, pois seu processamento geralmente é realizado de forma artesanal e envolve manipulação constante (NERO et al., 2007). A probabilidade de contaminação é favorecida pelo uso de temperaturas ligeiramente elevadas durante o

processamento, e pelas características físico próprias do produto, tais como baixa acidez e médio a alto teor de umidade (EL-BAKRY; SHEEHAN, 2014).

O parâmetro físico atividade de água (A_a) possui relevante importância para a qualidade do produto processado. Esse parâmetro indica se a quantidade de água disponível no alimento permite (ou não) aos micro-organismos realizarem diversas reações bioquímicas necessárias para seu crescimento e sobrevivência. Além disso, a a_a indica se um alimento possui maior ou menor perecibilidade. A maioria dos micro-organismos patogênicos possui crescimento ótimo em valores de a_a entre 0,95 e 0,98, embora alguns sejam capazes de sobreviver em valores de a_a inferiores a 0,95 (ORDÓÑEZ et al., 2005b).

Uma condição importante no fabrico de queijo de coalho é a união da aplicação do sal e do estabelecimento do valor final de a_a . O sal adicionado ao produto causa redução da a_a , vindo, por consequência, inibir o crescimento da maioria das bactérias deteriorantes e patogênicas (BERESFORD et al., 2001). Isto ocorre porque o soluto fixa a água presente no alimento por meio de pontes de hidrogênio, ocasionando a diminuição da a_a , tendo como resultado final menor quantidade de água disponível para o desenvolvimento microbiano (ORDÓÑEZ et al., 2005a). Outro parâmetro de importância na matriz queijo refere-se ao pH (concentração de H^+), pois também possui a capacidade de limitar o número de micro-organismos possíveis de se desenvolver neste ambiente. Porém, grande parte dos micro-organismos contaminantes de alimentos pode se desenvolver em uma faixa de pH em torno da neutralidade (6,6 - 7,5); embora, de forma geral, as bactérias patogênicas apresentem-se mais exigentes em relação a este parâmetro (GAVA et al., 2009).

No estudo realizado por Vidal (2011) foram encontrados valores de pH entre 6,51 e 6,81 em amostras artesanais de queijo de coalho, enquanto nas amostras industrializadas tais valores oscilaram entre 6,18 e 6,90; o que ratifica o produto como sendo de baixa acidez e dentro da faixa ótima de pH para o crescimento de micro-organismos. Além disso, os valores de a_a nas amostras do queijo de coalho estudadas apresentaram-se entre 0,964 – 0,983 e 0,967 – 0,999 para as amostras artesanais e industrializadas, respectivamente. Em estudo realizado por Silva et al. (2010) foram detectados valores de pH entre 5,98 e 7,13 em amostras de queijo de coalho, caracterizando a condição de queijos frescos e recém processados. Porém, os valores de pH próximos de 7,0 detectados nos estudo foram relacionados com possível ação de fungos filamentosos e leveduras contaminantes do produto, os quais possuem a capacidade de degradar o ácido láctico resultante do metabolismo de bactérias lácticas presentes na matriz (BERESFORD, 2004). Souza et al. (2014) ao avaliarem os parâmetros físico-químicos em amostras de queijo de coalho, com e sem Selo de Inspeção Federal, encontraram

valores médios de pH de 5,68 e 5,18, respectivamente. Para Munck (2004), amostras de queijo que apresentam valores de pH altos (~ 5,7, quando se usa fermento no processamento; chegando a ~ 6,5, quando não se usa fermento) proporcionam condições favoráveis para o crescimento de bactérias contaminantes.

Além dos parâmetros intrínsecos, a sobrevivência e multiplicação de micro-organismos dependem da temperatura do ambiente onde se mantém o produto, a qual é um dos fatores extrínsecos mais importantes para o controle de micro-organismos em alimentos durante a cadeia de produção e distribuição (TREMARIN, 2015). Neste contexto, a temperatura empregada na conservação dos alimentos possui papel importante, principalmente naqueles produtos que necessitam ser mantidos sobre refrigeração em decorrência da sua elevada perecibilidade. Dentre estes alimentos, encontram-se os queijos frescos ou de baixa maturação, os quais geralmente são conservados por meio do emprego de baixas temperaturas (0 e 10 °C). Apesar dos micro-organismos serem capazes de se multiplicar em temperatura de refrigeração, a velocidade de crescimento diminui consideravelmente nesta condição. Quando sob condições de baixa temperatura, ocorre a diminuição da fluidez da membrana bacteriana, o que influencia diretamente na velocidade das reações enzimáticas responsáveis pelo seu metabolismo (MADIGAN et al., 2010). A refrigeração, além de reduzir a velocidade de multiplicação microbiana, é responsável também pela redução das alterações químicas dos alimentos, proporcionando o aumento da vida de prateleira (MASSAGUER, 2005).

Desta forma, o emprego de temperatura de refrigeração deve ser estritamente controlado em toda a cadeia produtiva, pois variações da temperatura podem levar a rápida multiplicação microbiana, como diminuição da qualidade do produto e elevação de potenciais riscos à saúde dos consumidores (MASSAGUER, 2005; NYCHAS, 2008).

2.1.3 *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. como patógenos alimentares

Diversos surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) envolvem o consumo de produtos de origem animal, como o leite e seus produtos derivados (DWIVEDI et al., 2011; SAFE FOOD, 2014). As DTAs ocorrem em todo o mundo causando diminuição da qualidade de vida dos indivíduos, perda de produtividade e elevados custos com saúde devido ao significativo número de hospitalizações, com repercussões econômicas e sociais (KADARIYA et al., 2014; MUTHAIYAN; RICKE; GUSTAFSON et al., 2014). Relato da Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que uma em cada dez pessoas adoeça no

mundo por ano devido a DTAs (WHO, 2015). Nos países em desenvolvimento ocorrem, anualmente, mais de um bilhão de casos de diarreia aguda em crianças menores de cinco anos relacionadas ao consumo de alimentos e água contaminados, das quais 2 milhões chegam ao óbito, segundo registros da OMS (SILVA et al., 2013). Durante 1998-2011, dentre os alimentos notificados pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos como envolvidos em surtos de DTAs, o queijo foi o alimento que apresentou mais implicações. Estes surtos resultaram em 1.882 indivíduos acometidos, 230 hospitalizações e seis mortes (HAMADI et al., 2014).

No Brasil, dentre os atendimentos realizados por unidades do Sistema Único de Saúde (SUS) no período de 2010 a 2013, aproximadamente 4,8% foram relacionados ao diagnóstico de DTAs. Nesse período, foram registrados aproximadamente, 70 mil internações, com um custo estimado de 110 milhões de reais (ZELENY et al., 2015). O leite e seus derivados foram relacionados como sendo envolvidos em 3,4% dos surtos de DTA's ocorridos no Brasil entre 2000 e 2015 de acordo com dados registrados pelo Ministério da Saúde; entretanto, em 51% dos surtos não foi possível identificar o alimento envolvido (BRASIL, 2015).

As bactérias são consideradas os principais agentes etiológicos relacionados com a ocorrência de DTAs, representando mais de 2/3 dos agentes etiológicos dos surtos registrados (WINK, 2012). Dados do Ministério da Saúde também caracterizam as bactérias como os micro-organismos mais frequentemente associados a surtos de DTAs no Brasil, sendo responsáveis por 22,1% dos surtos entre 2000 e 2015 (BRASIL, 2015). Nas Figuras 1, 2 e 3 são apresentados os dados da ocorrência de surtos de DTAs no Brasil, dos alimentos e dos agentes etiológicos envolvidos, respectivamente, entre os anos de 2000 e 2015.

FIGURA 1. Série histórica de surtos e casos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil de 2000 a 2015*. Dados sujeitos a alteração. *Última atualização em outubro de 2015. **Fonte:** SINAN/SVS/Ministério da Saúde.

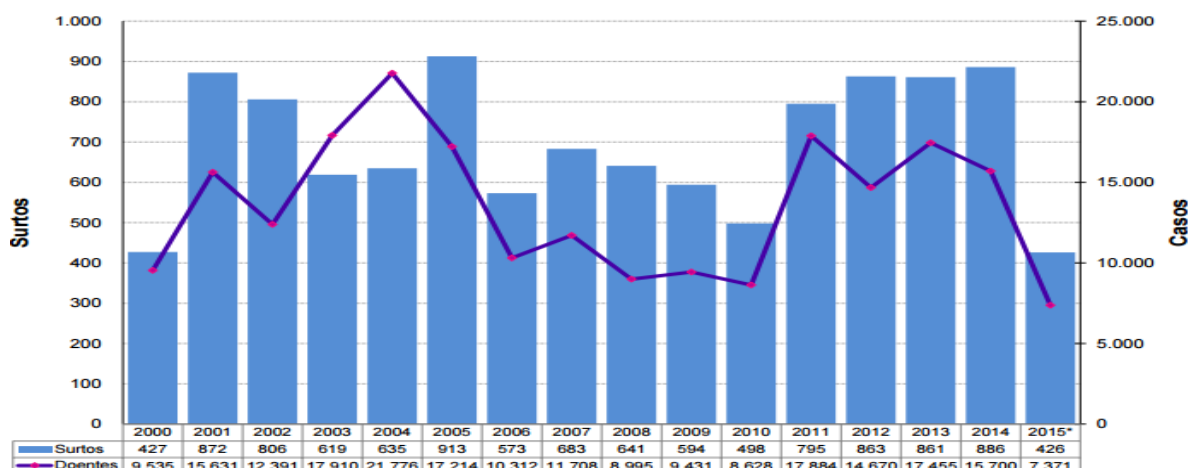


FIGURA 2. Distribuição dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil de 2000 a 2015. Última atualização em outubro de 2015. **Fonte:** Adaptado do SINAN/SVS/Ministério da Saúde.

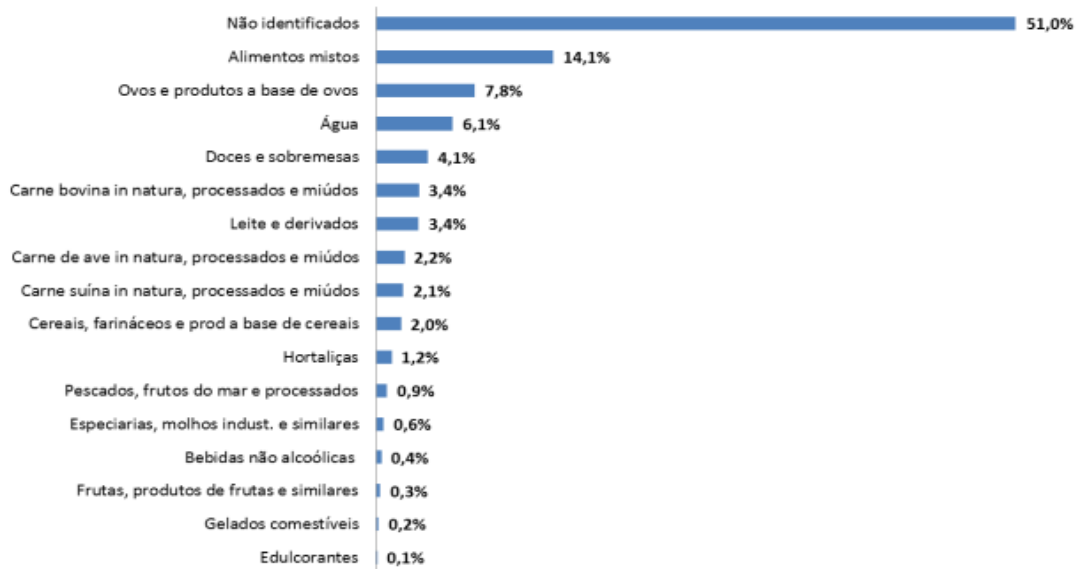
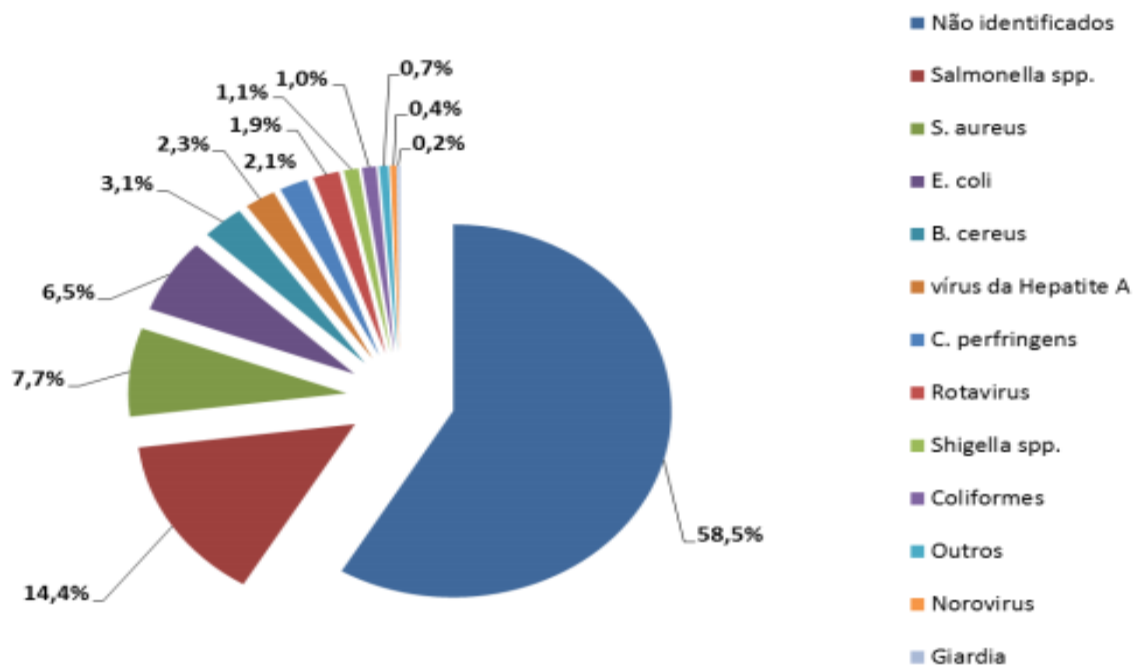


FIGURA 3. Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil de 2000 a 2015. Última atualização em outubro de 2015. **Fonte:** Adaptado do SINAN/SVS/Ministério da Saúde.



Estudos realizados no Brasil apresentam a detecção de diferentes bactérias potencialmente patogênicas em queijo de coalho, conforme apresentado no Quadro 1, destacando-se a frequência de detecção de *E. coli* como contaminante destes produtos.

QUADRO 1. Bactérias potencialmente patogênicas detectadas como contaminantes em amostras comerciais de queijo de coalho.

Bactérias contaminantes	Referências
<i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Salmonella</i> spp.	SILVA et al., 2010; SOUSA et al., 2014; SOARES et al., 2013; SANTANA et al., 2008; PEIXOTO et al., 2012.
<i>Staphylococcus</i> spp.	BORGES et al., 2008.
<i>L. monocytogenes</i>	BARANCELLI et al., 2011.
Coliformes totais e termotolerantes	DIAS et al., 2015.
<i>Salmonella</i> spp. e <i>Listeria</i> spp.	FEITOSA et al., 2003; YAMAGUCHI et al., 2013.
<i>E. coli</i>	SANTOS et al., 1995; MENESES et al., 2013; FLORENTINO et al., 1999; LEITE et al., 2002; MATTOS et al., 2010; SALOTTI et al., 2006; SILVA et al., 2012; HARDY et al., 2003; MILKA et al., 2014; ZILÁ et al., 2014; RUWER et al., 2011; PAIVA et al., 1999; TESHIMA et al., 2004;

Na produção de queijos a presença de micro-organismos patogênicos é preocupante, e, frequentemente, a bactéria *L. monocytogenes* é encontrada como contaminante destes produtos. Martin et al. (2014) corroboram citando que as principais fontes de infecções causadas por *L. monocytogenes* são os queijos, seguido de outros alimentos como produtos de aves, de carne bovina, legumes, frutos do mar e saladas, principalmente quando são armazenados sob refrigeração por longos períodos ou submetidos a aquecimento insuficiente (MELO et al., 2015). Além dessas fontes, essa bactéria se encontra amplamente presente em unidades de processamento de alimentos (MELO; ANDREWS; FALEIRO, 2015).

O crescimento ótimo de *L. monocytogenes* ocorre a 30 °C, porém pode se desenvolver em temperaturas na faixa de 0 a 45 °C. Existem relatos sobre o crescimento *L. monocytogenes* a 0 °C e sobrevivência mesmo após congelamento e descongelamento, secagem e em cultivo em elevadas concentrações de sal. A a_w ótima para o crescimento de *Listeria monocytogenes* é próxima a 0,97, porém pode se multiplicar em torno de 0,92, enquanto o pH ótimo está entre

6,0 e 8,0, embora possa se multiplicar entre 4,0 e 9,5 (CARPENTIER; CERF, 2011; LUZ et al., 2012a; LINO; KOUTSOUMANIS, 2013). *L. monocytogenes* é reconhecida por causar a listeriose que atinge, principalmente, indivíduos com o sistema imune comprometido como grávidas, idosos, recém-nascidos, portadores de neoplasias e da síndrome da imunodeficiência adquirida (LIN et al., 2011). A listeriose é considerada um grave problema de saúde devido à severidade dos sintomas e alta taxa de mortalidade (em torno de 30%), mesmo quando se emprega adequado tratamento com antibióticos (DALMASSO; JORDAN, 2014). A dose infectante para o estabelecimento da listeriose depende da virulência e patogenicidade da cepa de *L. monocytogenes*, bem como do estado de saúde do hospedeiro. Entretanto, pelo menos 10^2 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) por grama ou mililitro de alimento são necessários para causar a infecção (JEMMI; STEPHAN, 2006). As manifestações clínicas da listeriose em adultos são decorrentes, principalmente, de infecções no sistema nervoso central (SNC) como meningite e encefalite, além de outras infecções como endocardite, peritonite, pneumonia e osteomielite (BARANCELLI et al., 2014). Em gestantes, a *L. monocytogenes* pode provocar abortamento, nascimento prematuro, morte fetal, meningite ou septicemia neonatal (RAJKOVIC et al., 2011). Devido a sua elevada patogenicidade, a *Food Safety and Inspection Service* (FSIS) e a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos estabeleceram "tolerância zero" para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo (SHEEN; HWANG; JUNEJA, 2011).

S. aureus é uma bactéria patogênica que apresenta elevada prevalência em queijos. Esse micro-organismo produz uma ou mais enterotoxinas resistentes ao calor, levando ao desenvolvimento da intoxicação estafilocócica alimentar (LEITE JÚNIOR et al., 2001; CUNHA NETO et al., 2002; BORGES et al., 2003), a qual ocorre está entre as DTAs mais prevalentes em todo mundo (LV et al., 2014).

A temperatura ótima de crescimento de *S. aureus* varia entre 35 e 41 °C, sendo classificado assim como um micro-organismo mesófilo; porém, pode crescer em uma faixa ampla de temperatura que varia de 6,0 e 48,5 °C. Devido a capacidade de se manter viável em baixa a_a (0,83 a 0,86), em ampla faixa de pH (4,0 a 10), com ótimo crescimento entre 6,0 e 7,0, e em elevadas concentrações de cloreto de sódio (até 20%). O *S. aureus* é capaz de sobreviver e se multiplicar em uma ampla variedade de alimentos (RODRIGUEZ-CATURLA et al., 2012).

Células de *S. aureus* são produtoras de enterotoxinas, principalmente quando presentes em ambientes com temperatura entre 40 e 45 °C (SOUZA et al., 2010). A intoxicação estafilocócica ocorre após a ingestão de alimentos contendo uma ou mais enterotoxinas

estafilocócicas (ESs) pré-formadas, que podem provocar sintomas de vômitos e diarreia em, aproximadamente, quatro horas após o seu consumo (ARGUDÍN et al., 2012). A duração do quadro clínico é geralmente curta, terminando entre 24 a 48 horas após o início dos sintomas, e a completa recuperação ocorre entre um a três dias. A quantidade necessária de ESs para causar intoxicação varia entre, aproximadamente, 100 e 200 ng (WALLIN-CARLQUIST et al., 2010).

Em diversos estudos realizados com queijo de coalho produzidos no Nordeste brasileiro se observa frequentemente a ocorrência de *S. aureus*, e em contagens superiores ao limite estabelecido pela legislação vigente (10^3 UFC/g) (BORGES et al., 2003; BRUNO et al., 2003; FEITOSA et al., 2003). Esta bactéria tem sido mencionada como prevalente em ambientes de queijarias e recebe especial atenção por ser capaz de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, que são tradicionalmente aplicadas para o armazenamento dos produtos (ALVES, 2010).

A contaminação de alimentos por patógenos entéricos é uma das principais causas de doenças diarreicas em todo o mundo (CDC, 2013), sendo que existem vários relatos sobre o isolamento de *E. coli* em uma variedade de queijos em diversos países (HARAN et al., 2012; ZINKE et al., 2012). A *E. coli* pertence ao grupo dos coliformes termotolerantes, sendo um micro-organismo indicador, visto que a presença nos alimentos é utilizada para indicar a ocorrência de contaminação fecal direta ou indireta (ABDOLLAHZADEH et al., 2014; EL-BAKRY et al., 2014).

De modo geral, *E. coli* é considerada uma bactéria comensal saprófita; no entanto, diversos sorovares de *E. coli* apresentam potencial patogênico, sendo capazes de causar infecções intestinais e extra-intestinais por meio de diferentes mecanismos (EL-BAKRY et al., 2014). Considera-se que a dose infectante de *E. coli* para adultos seja de 10^5 a 10^8 UFC/g, todavia, esta dose varia de acordo com o estado imune e/ou a idade do indivíduo exposto, bem como da patogenicidade específica da cepa ingerida (ABDOLLAHZADEH et al., 2014).

As infecções causadas por *E. coli* caracterizam-se por diarreia aquosa, náusea, vômito, cólicas abdominais e febre baixa ou ausente (MELO et al., 2015). A transmissão de *E. coli* se dá por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados, geralmente não processados, ou que tiveram algum tipo de contaminação fecal durante a sua produção, principalmente pós-tratamento térmico. Vários surtos têm sido associados ao consumo de carne bovina mal cozida e diversos produtos à base de carne, leite cru, vegetais consumidos crus e molhos

preparados para saladas (LEE et al., 2009; SOLOMAKOS et al., 2009; BROOKS et al., 2012; MAFFEI et al., 2013; LV et al., 2014; MELO et al., 2015).

A presença de *E. coli* em um alimento é um dado importante que deve ser analisado com cautela, pois além de indicador, a espécie pode compreender cepas patogênicas. As cepas de *E. coli* patogênicas são classificadas de acordo com os seus mecanismos de patogenicidade (toxinas, adesinas e invasibilidade), danos a animais de laboratório e padrões de adesão a células eucarióticas em cultura. A classificação, considerando estes aspectos, inclui: i) *E. coli* enteropatogênica (EPEC); ii) *E. coli* enteropatogênica atípica (A-EPEC); iii) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); iv) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); v) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); vi) *E. coli* de adesão difusa (DAEC); e vii) *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (LIN et al., 2011).

Bactérias do gênero *Salmonella* são mesófilas, com crescimento entre 30 e 40 °C, mas alguns sorotipos são psicrotróficos, com capacidade de crescimento entre 5 e 30 °C; crescem em ampla faixa de pH (4,5 a 8,0), com ótimo entre 6,0 a 7,5. A a_a para crescimento varia de 0,93 a 0,96, entretanto podem sobreviver por longo período em alimentos com baixa a_a , e são capazes de crescer em concentrações moderadas (3 a 5%) de cloreto de sódio (D'AOUST et al., 2001; BOPP et al., 2003). Os sorotipos mais comuns de *Salmonella* associados a doenças humanas nos Estados Unidos e países europeus são *Salmonella* enterica sorotipo Typhimurium e *Salmonella* enterica sorotipo Enteritidis (MEAD et al., 1999; CUMMINGS et al., 2010; TURNER, 2010).

Estima-se em todo o mundo que a quantidade de gastroenterites causadas por *Salmonella* spp. é superior a 93,8 milhões de casos, resultando em 155.000 mortes por ano (HENDRIKSEN et al., 2011; TSOLIS et al., 2011). Há relatos de que apenas nos Estados Unidos ocorram a cada ano cerca de 1 milhão de episódios envolvendo gastroenterites com 19.000 internações e 400 óbitos devido a infecções causadas por *Salmonella* Typhimurium (LV et al., 2014). Por muitos anos, a *Salmonella* Typhimurium foi o sorovar mais envolvido em quadro de diarreia aguda no homem em diversos países (DUBOIS-BRISSONNET et al., 2011). Apesar das instruções bem estabelecidas e as medidas de prevenção conhecidas para se evitar a ocorrência de casos salmonelose, a incidência e severidade da doença têm aumentado significativamente ao longo dos anos (LEE et al., 2014).

A salmonelose é uma gastroenterite que acomete principalmente indivíduos com o sistema imune comprometido, caracterizada por febre, diarreia, vômitos e cólicas abdominais (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012; MARTÍN et al., 2014). A gastroenterite causada por *Salmonella* se manifesta entre 12 a 36 h após o consumo de alimentos contaminados, embora

o micro-organismos seja capaz de causar outras enfermidades como bacteremia, meningite, peritonite e miocardite (SIRINAVIN et al., 1999; BELLOSO et al., 2011; PAPAMICHALIS et al., 2011; VIDAL et al., 2011). A dose infectante para a ocorrência de salmonelose varia de 10^6 a 10^8 UFC/g, contudo o desencadeamento da doença depende da virulência e estado fisiológico da cepa, do grau de resistência do hospedeiro e da matriz alimentar carreadora (HUMPRHEY, 2004). Neste contexto, há relatos que surtos de gastroenterites causadas por cepas de *Salmonella* podem ocorrer com doses infectantes inferiores a 10 UFC/g (BLASER, 1982). Entre os agentes etiológicos envolvidos em surtos de DTAs no Brasil, *Salmonella* spp. é o mais frequente, sendo responsável por 14,5% dos casos relatados entre 2000 a 2014 (BRASIL, 2015).

2.1.4 Abordagem preditiva no estudo da sobrevivência e crescimento microbiano em alimentos

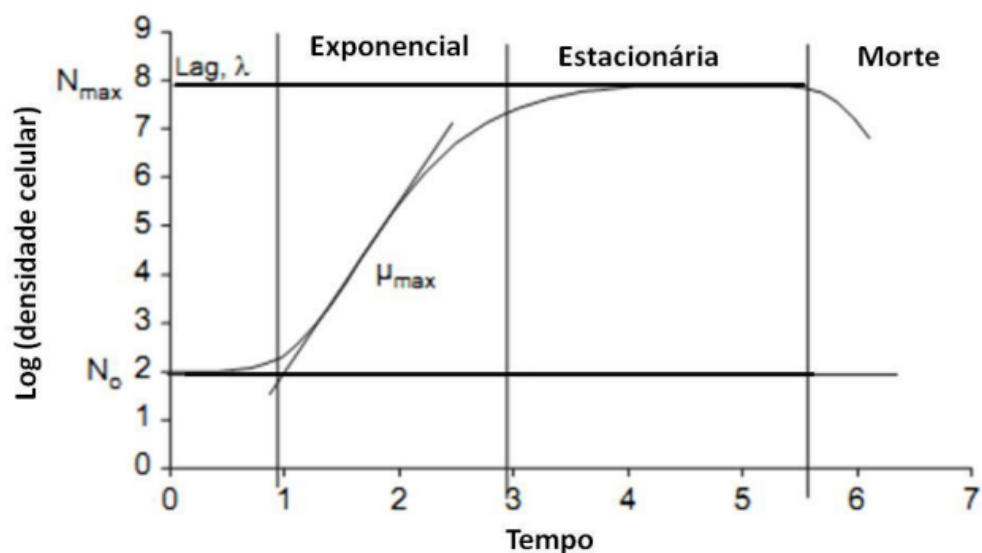
O entedimento do comportamento de patógenos microbianos em alimentos consiste em um aspecto importante para a promoção da segurança de alimentos. A este respeito, o campo científico da microbiologia preditiva oferece ferramentas para o desenvolvimento de estudos nesta temática, possibilitando estimar as consequências das operações de manipulação, processamento e armazenamento de alimentos sobre o crescimento, sobrevivência e inativação de micro-organismos (USDA, 2016).

A microbiologia preditiva consiste em uma área de pesquisa que busca estimar quantitativamente as respostas microbianas frente a diferentes ambientes (alimentos) por meio do uso de modelos matemáticos (POUILLOT; LUBRAN, 2011). Os modelos matemáticos mais utilizados são os modelos modificados logísticos (GIBSON; BRATCHELL, 1987), o modelo de Gompertz modificado (GIBSON; BRATCHELL, 1987) e o modelo de Baranyi (BARANYI et al., 1993; BARANYI; ROBERTS, 1994). Estes modelos matemáticos se baseiam nas características dos alimentos ou matérias-primas, e nas condições de processamento, armazenamento e distribuição para, assim, predizer a sua segurança para os consumidores (PSOMAS et al., 2011) e detectar pontos críticos de controles do processo de produção e distribuição (ZWIETERING et al., 1990).

O comportamento e crescimento das populações microbianas geralmente se apóiam nas curvas de crescimento/morte dos micro-organismos (USDA, 2016). As fases de crescimento microbiano nos alimentos podem ser estudadas observando vários fatores, incluindo o nível inicial de contaminação, a quantidade de nutrientes, temperatura, pH,

atividade da água, presença de aditivos e de outros micro-organismos. As bactérias podem aumentar em número (crescer), diminuir em números (inativar) ou permanecer em mesmo número (sobreviver). Os modelos preditivos podem ser desenvolvidos para cada um destes tipos de comportamento bacteriano. Na maioria dos casos, o crescimento microbiano pode ser dividido em três fases distintas: fase de latência ou lag, fase de crescimento, fase estacionária e fase de morte (USDA, 2016), como apresentadas graficamente na Figura 4, e abaixo caracterizadas:

FIGURA 4. Descrição gráfica das fases do crescimento microbiano e dos parâmetros de cinética de crescimento relacionados (Anjos, 2013).



- Fase de latência ou fase *lag*: definida como o tempo necessário para um determinado micro-organismo se adaptar ao novo meio onde se encontra. Ao ser exposto a um novo meio, o micro-organismo tem de realizar mudanças a nível celular que lhe possam permitir crescer no novo ambiente, como, por exemplo, a síntese de novas enzimas. Esta fase é a mais imprevisível de todas, uma vez que a adaptação do micro-organismo depende fortemente da composição do novo meio.

- Fase de crescimento exponencial: representa a fase de multiplicação dos micro-organismos. Após a adaptação ao novo meio, as células iniciam o seu crescimento e replicação. Ocorre um primeiro pico de aceleração na taxa de crescimento, que rapidamente se torna constante. Nesta fase, os nutrientes estão amplamente disponíveis no meio e a população microbiana cresce a uma taxa específica de crescimento máximo, dependente do

potencial genético do micro-organismo, da composição do novo meio e das condições de crescimento permitidas pelos fatores intrínsecos e extrínsecos.

- Fase estacionária: corresponde ao nível máximo que um micro-organismo consegue atingir no seu crescimento. Esta fase ocorre quando se dá o esgotamento de um nutriente essencial, acumulação de produtos inibidores do metabolismo e/ou a presença de outros micro-organismos competidores, os quais fazem com que o crescimento e multiplicação microbiana estagnem. No entanto, os micro-organismos podem manter-se viáveis por períodos de tempo mais ou menos longos.

- Fase de morte: caracteriza-se pela perda irreversível da capacidade de multiplicação por parte dos micro-organismos, levando à morte celular e refletindo no declínio da quantidade de células viáveis da população ao longo do tempo. A observação desta fase não é muito comum nos gêneros alimentícios, mas pode ocorrer após um longo período de armazenamento (USDA, 2016).

A microbiologia preditiva caracteriza-se como uma importante ferramenta na caracterização de alimentos como substratos favoráveis (ou não) para a sobrevivência e crescimento microbiano, visto que permite modelar o crescimento de micro-organismos em função de fatores controladores, tais como temperatura, a_w , pH e presença de sal (BARANYI; ROBERTS, 1994). Dentre os modelos disponíveis, o mais teórico é o de Baranyi e Roberts (2004), que se concentra em estimar a duração da fase *lag*, como também introduz novos conceitos como o estado fisiológico das células (FERRER et al., 2009).

Os modelos de previsão de crescimento microbianos podem ser divididos em: primários, secundários e terciários. O modelo primário realiza a predição da dinâmica da população dos micro-organismos ao longo do tempo sob determinadas condições ambientais e de cultivo, utilizando os parâmetros de crescimento: número inicial de células (N_0), número máximo de células (N_{max}), taxa específica de crescimento máxima (μ_{max}), e (λ) tempo da fase *lag* (LIU; YANG, LI, 2006).

Dentre os modelos primários mais utilizados estão os de Gompertz e Baranyi, porém, geralmente, ocorre a opção pelo modelo de Baranyi, visto que o modelo de Gompertz pode superestimar o tempo da fase *lag* e a taxa específica de crescimento máximo (BARANYI; ROBERTS, 1994; ZWIETERING et al., 1990).

Desde os anos 90, o modelo desenvolvido por Baranyi e Roberts (1994) tem sido utilizado, o qual encontra-se disponível *on line* (www.combase.cc), onde também se encontra o DMFIT *Predictor*, que são distribuídos pelo *Institute of Food Research*, do Reino Unido. O modelo de Baranyi e Roberts é definido pela equação matemática:

$$\frac{dN}{dt} = \frac{q(t)}{1+q(t)} \mu_{\max} \frac{(1 - (N(t)^m)N(t)}{N_{\max}} \quad (1)$$

$$\frac{dq}{dt} = \mu_{\max} \cdot q(t) \quad (2)$$

O N representa o número de células existentes no tempo (t), $\mu_{\max}$ é a densidade máxima de células e $q(t)$ é a média filosófica das células, a qual se altera com o tempo, $\frac{q(t)}{1+q(t)}$

representa o ajuste da função $\alpha(t)$ como fator extra para descrever a fase *lag* de crescimento. Essa função permite a transição da fase *lag* para a fase de crescimento exponencial, por descrever a diminuição gradual do efeito do ambiente embutido em $q(0)$, que representa o estado fisiológico inicial das células no momento da inoculação (SWINNEN et al., 2004).

$$\alpha(t) = \frac{q(t)}{1+q(t)} \quad (3)$$

A transformação mais estável de $q(0)$ pode ser definida através da equação 4.

$$h(t) = \ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right) = -\ln \alpha(t) \quad (4)$$

O valor $h_0 = h(0) = -\ln \alpha(0)$, que é o produto da taxa específica de crescimento máximo e de *lag*. Portanto, esse produto é constante para as diferentes curvas de crescimento, desde que o estado fisiológico das células na inoculação seja idêntico (BARANYI; ROBERTS, 1994). Ainda, pode apresentar a equação de multiplicação que incorpora a fase *lag*, exponencial, estacionária e fase de crescimento, formulada por Baranyi e Roberts (1994):

$$N_t = N_{\max} - \ln[1 + (\exp(N_{\max} - N_0) - 1) \exp(-\mu_{\max} A(t))] \quad (5), \text{ onde:}$$

N_t = tamanho da população logarítimo;

N_0 = tamanho da população inicial;

$N_{\max}$ = população máxima (log);

$\mu_{\max}$ = taxa máxima de crescimento específico;

$A(t)$ = integral de ajuste de função.

Entre as razões existentes para o uso deste modelo tem-se a sua boa capacidade de ajuste, e o fato de que os parâmetros do modelo são biologicamente interpretáveis. Este modelo introduz um conceito de estado fisiológico das células definido pelo parâmetro h_0 (BARANYI; ROBERTS, 1994; FERRER et al., 2009).

Os modelos secundários descrevem as respostas dos parâmetros primários às mudanças nas condições do ambiente (GUMUDAVELLI et al., 2007), ou seja, prediz o crescimento microbiano associando a taxa de multiplicação em função dos parâmetros como a temperatura ou do pH, utilizando o modelo de raiz quadrada, conhecido como o modelo de Ratkowsky (RATKOWSKY et al., 1982). Por sua vez, os modelos terciários utilizam um ou mais modelos secundários ou primários para gerar um *software* (BARANYI; TAMPLIN, 2004). Esses modelos têm exibido alta precisão em prever o comportamento microbiano em condições diversas (POUILLOT; LUBRAN, 2011). Os exemplos clássicos desses modelos são: *Pathogen Modeling Program*, *ComBase Predictive models*, *Food MicroModels*, entre outros; de modo que os dois primeiros modelos são de livre acesso (ROSS; MCMEEKIN, 2003).

O ComBase é um banco de dados que contém informações sobre as respostas dos micro-organismos a diferentes condições experimentadas. Este software consiste em um banco de "dados" de microbiologia quantitativa, uma vez que descreve como os níveis de crescimento de uma população microbiana (dados cinéticos), seja de um micro-organismo deteriorante ou patogênico, em dada condição se altera ou evolui ao longo do tempo (USDA, 2016).

O ComBase é uma produção do *Institute of Food Research* do Reino Unido, do *United States Agricultural Research Service* (USDA-ARS) dos Estados Unidos e do *Australian Food Safety Consortium of Excellence* (AFSCoE) da Austrália. Por meio da sua interface com a *Internet*, o ComBase permite o usuário identificar os critérios que são relevantes para um cenário específico, incluindo o nível de acidez, a temperatura, a atividade da água (ou a concentração de NaCl) e a presença de condições específicas encontradas nos alimentos, tais como aditivos e atmosfera de acondicionamento (USDA, 2016). Para validar os modelos matemáticos obtidos no ComBase são utilizados os índices estatísticos de coeficiente de determinação (R^2), erro médio quadrático (MSE) ou raiz do erro médio quadrado (RMSE) (ROSS, 1994). O coeficiente de determinação (R^2) fornece uma medida da proporção da variação em relação à variação total das respostas. Os valores (R^2) mais próximos de 1 são considerados os melhores (GEITENES et al., 2013).

O DMFit é uma planilha construída no programa Excel, a qual é disponibilizada pelo ComBase, para ajustar curvas de crescimento, em que a fase de crescimento do micro-organismo é precedida pela fase *lag* no sistema. Esse recurso computacional é amplamente utilizado com a finalidade de modelar a variação do logaritmo das concentrações de células de culturas bacterianas em relação ao tempo, e tem como entre as suas respostas a duração do

“tempo de latência/fase *lag*” e a “taxa máxima de crescimento”. O programa é baseado no trabalho de Baranyi e Roberts (1994) intitulado “A dynamic approach to predicting bacterial growth in food”, publicado em 1994 na revista “International Journal of Food Microbiology” (www.combase.cc), e faz parte dos modelos terciários disponíveis para a realização de previsões. Davey (1994) afirma que a modelagem matemática diminui a necessidade de realização de análises microbiológicas que consomem longo tempo para a execução, e dependem de disponibilidade considerável de consumíveis e infra-estrutura de laboratório.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE QUEIJO DE COALHO

Cem amostras de queijo de coalho pertencentes a dez marcas diferentes (dez amostras de cada marca e cada amostra pertencente a um lote diferente), as quais possuíam SIF (Selo de Inspeção Federal) ou SIE (Selo de Inspeção Estadual) no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento foram compradas em supermercados locais (João Pessoa, Paraíba). Cada amostra foi constituída por, aproximadamente, 500 g, e todas foram obtidas nos primeiros 10% (dias) do seu período de vida de prateleira. Na coleta das amostras foram certificados da ausência de sinais visíveis de alterações e de violação da embalagem; no laboratório, as amostras foram novamente submetidas à avaliação quanto à ausência de limosidade superficial.

3.2 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA, pH E a_a DAS AMOSTRAS DE QUEIJO DE COALHO

Os valores de pH e a_a nas amostras de queijo de coalho foram medidos usando um potenciômetro digital (Modelo 0400AS; Quimis[®], Diadema, Brasil) e um dispositivo Aqualab (Sistema de Atividade de Água modelo CX-2, Washington, EUA), respectivamente, seguindo procedimentos padrão (AOAC, 2012) e instruções de operação dos fabricantes. A temperatura das amostras de queijo adquiridas no comércio foi medida no local de armazenamento do queijo, usando um termômetro infravermelho (Modelo TCI1000, Incoterm, Porto Alegre, Brasil). Para cada amostra, os valores de temperatura, pH e a_a foram analisados em triplicata, e expressos como valores médios destas verificações. Os dados obtidos para cada parâmetro monitorado foram organizados em ordem crescente, e expressos em dados de frequência por meio de valores de percentis 25, 50, 75 e 90 e valores mínimos e máximos.

3.3 PROCESSAMENTO DOS DADOS E PREVISÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DO CRESCIMENTO BACTERIANO

Os valores de temperatura, pH e a_a representativos das amostras de queijo de coalho disponíveis no mercado foram avaliados em várias combinações com relação a seus efeitos como fatores de controle sobre a cinética de crescimento de *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* utilizando o ComBase Predictor (<http://modelling.combase.cc/>). O ComBase Predictor foi utilizado para estimar a taxa máxima de crescimento (G_{max} ; log

UFC/g/ h). Além disso, os efeitos da taxa máxima de crescimento bacteriano foram observados utilizando modelos de crescimento que representam a evolução das populações bacterianas (log UFC/g) ao longo de 504 horas (21 dias). A temperatura mínima e a_a utilizadas nas predições envolvendo *E. coli* foram 10 °C e 0,96, respectivamente; e a a_a mínima utilizada nas predições envolvendo *Salmonella* spp. e *S. aureus* foram de 0,97 e 0,91, respectivamente. Os modelos disponíveis no ComBase *Predictor* não permitem a seleção de menores valores de temperatura e a_a .

3.4 MODELAGEM DO CRESCIMENTO *E. coli* EM QUEIJO DE COALHO

3.4.1 Cepas bacterianas e preparo do inóculo

Três cepas de *E. coli* (ATCC 11303, ATCC 29214 e ATCC 25922), as quais foram fornecidas pelo Coleção de Microrganismos de Referência, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro), foram usadas como cepas teste. Cada cepa foi adaptada a um antibiótico específico de modo a facilitar a sua recuperação entre a presença da microflora presente no queijo quando inoculada em ágar contendo o mesmo antibiótico. As variantes de *E. coli* ATCC 11303 resistente a gentamicina (ECgent), *E. coli* ATCC 29214 resistente ao ácido nalidíxico (ECNA) e *E. coli* ATCC 25922 resistente a estreptomicina (ECStrept) foram obtidas por meio de cultivos consecutivos por 18 h em caldo Muller-Hinton (CMH, HiMedia, Índia) contendo concentrações crescentes de gentamicina, ácido nalidíxico e estreptomicina, respectivamente. Por meio dos sucessivos cultivos foi possível obter as cepas resistentes até concentrações de 3 µg/mL de gentamicina, 1 µg/mL de ácido nalidíxico e 64 µg/mL de estreptomicina. Foram realizados experimentos de crescimento e sobrevivência de todas as variantes de *E. coli* obtidas em amostras de queijo de coalho mantidas sob refrigeração para confirmação da estabilidade da resistência induzida a cada um dos antibióticos, bem como de manutenção de comportamento semelhante ao apresentado pelas respectivas cepas parentais (que originaram as variantes obtidas).

Antes dos ensaios, e para garantir a manutenção das características fisiológicas das células bacterianas que compunham os inóculos iniciais utilizados nos ensaios, as variantes ECgent, ECNA e ECStrept foram cultivadas duas vezes em CMH contendo 3 µg/mL de gentamicina, 1 µg/mL de ácido nalidíxico e 64 µg/mL estreptomicina, respectivamente, durante 18 a 20 h a 37 °C. Depois disso, as culturas foram recolhidas por meio de centrifugação (4500 g, 15 min, 4 °C), lavadas duas vezes em solução salina estéril (NaCl a

0,85 g/100 mL) e re-suspensas em solução salina estéril para obter suspensões de células em que a leitura da densidade óptica a 625 nm fosse de 0,1. Estas suspensões apresentaram contagens de células viáveis de aproximadamente 6 log de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL (UFC/mL) quando inoculadas em ágar Muller Hinton (AMH; HiMedia, Índia) suplementado com o respectivo antibiótico na sua concentração final pré-estabelecida. Para uso nos ensaios de crescimento bacteriano em amostras de queijo de coalho, as suspensões foram diluídas (1:100) em solução salina estéril com o intuito de se obter suspensões com contagens de células viáveis de, aproximadamente de 4 log UFC/mL.

3.4.2 Preparação de amostras de queijo de coalho, procedimento de inoculação e avaliação do crescimento das variantes de *E. coli*

Inicialmente, as amostras de queijo de coalho foram assepticamente removidas das suas embalagens originais, cortadas em fatias de 25 g (aproximadamente 3,8 cm de largura, 5,5 cm de comprimento e 1,1 cm de altura) em uma cabine de segurança biológica utilizando superfície de vidro e faca de aço inoxidável esterilizadas. Em seguida, uma alíquota de 10 µL da suspensão da cepa mutante de *E. coli* foi dispensada de forma homogênea em dez pontos diferentes sobre a superfície da amostra de queijo, a qual foi previamente obtida durante 18 h e em temperatura de incubação apropriada. Um volume total de 100 µL de suspensão da cepa mutante foi inoculado em cada fatia de queijo, compreendendo uma contagem inicial de, aproximadamente, 3 log UFC/g. As fatias de queijo inoculadas foram mantida em uma câmara de segurança biológica durante 20 min para absorver completamente as porções da suspensão bacteriana, e, em seguida, dispostas em sacos estéreis de propileno (volume de 400 mL), os quais foram fechados hermeticamente e armazenados a $10 \pm 0,5$ °C. Em diferentes intervalos de tempo de armazenamento (0 h – imediatamente após a inoculação, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 1 d, 2, e 3 d, 5 d, 7 d, 14 d e 21 d) a enumeração da população da cepa mutante de *E. coli* nas amostras de queijo contaminadas *in vitro* foi realizada por meio da suspensão (1:9) da respectiva amostra em 225 mL de água peptonada (0,1g/100 mL) esterilizada, sendo submetida a processo de homogeneização utilizando equipamento Stomacher (Modelo A440, Marconi equipar. Lab. Ltda., Piracicaba, Brasil), durante 3 minutos à temperatura ambiente. Subsequentemente foram realizadas diluições seriadas (10^{-2} - 10^{-7}) em água peptonada esterilizada, e alíquotas de 100 µL de cada diluição foram inoculadas, por meio da técnica de espalhamento em superfície, em AMH contendo 3 µg/mL de gentamicina, 1 µg/mL de ácido nalidíxico ou 64 µg/mL de estreptomicina, seguindo-se por incubação a 37 °C (48-72 h).

Após o período de incubação, foi realizada a contagem de células viáveis nos meio inoculados, e os resultados foram expressos como log UFC/g de queijo coalho (log UFC/g). Como controle, as amostras de queijo de coalho não inoculadas com as cepas mutantes foram submetidas ao mesmo protocolo experimental.

O crescimento de cada cepa mutante de *E. coli* foi avaliado em três diferentes amostras de queijo, e cada ensaio foi repetido três vezes em experimentos independentes. As amostras de queijo de coalho utilizadas nestes ensaios apresentaram valores médios de pH e a_a de 6,88 ($\pm 0,26$) e 0,96 ($\pm 0,03$), respectivamente. Estes valores foram determinados utilizando os mesmos procedimentos anteriormente citados (item 3.2).

3.4.3 Modelagem dos dados

Os dados de crescimento microbiano foram avaliados por meio de modelos primários que descrevem a cinética de crescimento ao longo do tempo de armazenamento. As contagens de células viáveis foram transformadas em log, e introduzidas em planilha Excel juntamente com o respectivo intervalo de tempo de monitoramento (dados brutos do crescimento). O modelo de crescimento primário de Baranyi e Roberts (1994) foi montado para os dados brutos de crescimento disponíveis no DMFit, o qual caracteriza-se como uma planilha do *Microsoft Excel* desenvolvido pelo *Institute of Food Research* (Norwich, Reino Unido), que possibilita calcular estimativas dos parâmetros cinéticos: taxa de crescimento máximo (G_{max} , expressos em log UFC/g/h) e o tempo de latência (λ , expresso em horas). O G_{max} obtido para cada cepa foi comparado com aquele predito para *E. coli* em função de condições similares de temperatura, pH e a_a .

3.4.4 Análise estatística

Os dados de G_{max} e λ das obtidos para as diferentes cepas de *E. coli* quando inoculadas nas amostras de queijo foram verificados para existência de diferenças por meio de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos com $P \leq 0,05$. Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o software computacional GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Prism Inc., Califórnia, EUA).

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, E.; REZAEI, M.; HOSSEINI, H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 177-183, 2014.
- ALVES, C. C. D. Comportamento da *Escherichia coli* em queijo minas frescal elaborado com utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta com ácido láctico. Niterói. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Fluminense, Niterói, 80p, 2010.
- ANJOS, L.D.dos. Modelos de Crescimento de Psicrotóxicos em Diferentes Temperaturas e p, Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras. Lavras: UFLA, p. 126, 2013.
- AOAC. (2005). Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International., 18th ed.
- ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; GONZÁLEZ-HEVIA, M. A.; BANCES, M.; GUERRA, B.; RODICIO, M. R. Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. **Applied Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2930-2935, 2012.
- BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: a Review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 722-734, 2012.
- BARANCELLI, G. V.; CAMARGO, T. M.; GAGLIARDI, N. G.; PORTO, E.; SOUZA, R. A.; CAMPIONI, F. Pulsed field gel electrophoresis characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cheese manufacturing plants in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, n. 3, p. 21-29, 2014.
- BARANYI, J. TAMPLIN, M.L. ComBase: A Common Database on Microbial Responses to Food Environments. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 9, p. 1967-1971, 2004.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3-4, p. 277-294, 1994.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A.; MCCLURE, P. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. **Food Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 43-59, 1993.
- BELLOSO, W. H. et al. Recurrent Meningitis and Subarachnoid Hemorrhage Due to *Salmonella* in an HIV+Patient: Case Report and Mini-review of the Literature. **The Open Aids Journal**, v. 5, p. 62 - 66, 2011.

BERARD, L.; MARCHENAY, P. La Construcción Social de los Productos de la Tierra. **Agricultura y Sociedad**, v.1, n. 80-81, p. 31-56, 1996.

BERESFORD T, WILLIAMS A. The microbiology of cheese ripening. In: Fox PF, McSweeney OLH, Cogan TM, Gueene TP. Cheese chemistry, physics and microbiology. 3 ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004.

BLASER, J.N.L.S. A review of human salmonellosis: I. Infective Dose. **Revista Infecto Diseases**, v.4, n.6, p. 1096 – 1106, 1982.

BORESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L., COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v.11, n. 4-7, p.259-274, 2001.

BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F de; FIGUEIREDO, E. A. T. Micro-organismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 31-40, jan./jun. 2003.

BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L. et al. Perfil de contaminação de *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1431-1438, 2008.

BORGES, M. F. Interferência da microbiota autóctone do queijo coalho sobre staphylococcus coagulase positiva. **Revista Ciência Agronômica**, v. 422, n. 2, p. 337 – 341, 2011

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de Junho de 2001(b). Anexo II- Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, nº135-E, segunda-feira, 16 de Julho de 2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Regulamento Técnico de identidade e qualidade de queijos. Portaria nº 146, de 07/03/1996. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11/03/1996. p. 3977-3978.

BRASIL, Portaria nº 352 de 1997 do ministério da Agricultura e do Abastecimento. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1997.

BRASIL, Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe Sobre Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos. **Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF. 10 jan 2001. Seção 1, nº 7-E, p.1415-53.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001a do Departamento de Inspeção de produtos de origem animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 jul 2001b. Seção I, p.13-5.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças Transmitidas por alimentos. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>>. Acesso em 11 de Maio de 2016.

BRASIL. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN net) Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, DF, 2014.

BRASIL. Doenças Transmitidas por Alimentos. Disponível em: Acesso em: maio. 2015a.

BROOKS, J.C.; MARTINEZ, B.; STRATTON, J.; BIANCHINI, A.; KROKSTROMB, R.; HUTKINS, R. Survey of raw milk cheese for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. **Food Microbiology**, v.31, n.2, p.154-158, 2012.

BRUNO, L.M.; QUEIROZ, A.A.M.; ANDRADE, A. P. C.; VASCONCELOS, N.M.; BORGES, M. F. Avaliação microbiológica de hortaliças e frutas minimamente processadas e comercializadas em Fortaleza (CE). **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 23, n.1, p. 75-84, jan./jun. 2005.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Review -Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 1-8, 2011.

CAVALCANTI, J. F. M. ANDRADE, N. J., FURTADO, M. M., FERREIRA, C. L. L. F., PINTO, C. L. O. ELARD, E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctea endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1 p. 105-214, 2007.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996-2012. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.62, n. 15, p. 283-287, 2013.

CORREIA, L. J. H. Diagnóstico das condições ambientais e avaliação dos riscos microbiológicos no processamento de queijo coalho. Tese (Doutorado em engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande. Centro de Ciências e Tecnologia. 2011.

CUMMINGS, K. J. et al. The effect of clinical outbreaks of Salmonellosis on the prevalence of fecal *Salmonella* shedding among dairy cattle in New York. **Foodborne Pathogens and Disease**, v 7, n.7, p. 815- 823, 2010.

DALMASSO, M.; JORDAN, K. Absence of growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 81, n. 1, p. 46-53, 2014.

DANNENHAUER, C. E. Desenvolvimento de um Aplicativo Computacional para Microbiologia Preditiva. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 147p, 2010.

DAVEY, K.R. Modeling the combined effect of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, n. 3-4, p.295-303, 1994.

DIAS, J. N. et al. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de leite cru e queijo coalho comercializados em mercados públicos no norte do Piauí. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 2, p. 277-284, 2015.

DUARTE, D. A. M. et al. Pesquisa de *Listeria Monocytogenes* e Microrganismos Indicadores Higiênico-Sanitários em Queijo de Coalho Produzido e Comercializado no Estado de Pernambuco. **Arquivo do Instituto Biologia**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297-302, jul./set, 2005.

DUBOIS-BRISSENET, F. et al. Induction of fatty acid composition modifications and tolerance to biocides in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by plant-derived terpenes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 3, p. 906 -910, 2011.

DWIVEDI, H. P.; JAYKUS, L. -A. Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions. **Clinical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 40-63, 2011.

EL-BAKRY, M; SHEEHAN, J. Analysing cheese microstructure: A review of recent developments. **Journal of Food Engineering**, v. 125, p. 84-96, 2014.

FDA (2016) Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods - Chapter 3. Factors that Influence Microbial Growth disponível em <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094145.htm>, acesso em Maio de 2016.

FEITOSA, M.T., BORGES, M.F., NASSU, R.T., DE AZEVEDO, E.H.F., MUNIZ, C.R. 2003. Survey of *Salmonella* sp., *Listeria* sp. and hygienic-sanitary indicator microorganisms

in cheese manufactured in the state of Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, suppl 0, p.162-165, 2003.

FERRER, J. et al. Review Mathematical modeling methodologies in predictive microbiology food: A SWOT analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v.134, n. 1-2, p. 2-8, 2009.

FLORENTINO, E. R.; MARTINS, R. S. Características microbiológicas do “queijo de coalho” produzido no estado da Paraíba. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.59, p.43-48, 1999.

GAVA, A. J. Tecnologia dos alimentos: princípios e aplicações. São Paulo: Nobel, 2009.

GEITENES, S. Modelagem do Crescimento de Bactérias Láticas e Análise Microbiológica em Apresuntado e Presunto Cozido Fatiados e Embalados a Vácuo. **Revista Ciências Exatas e Naturais** v. 15, n. 1, p. 113–133, 2013.

GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T. A. The effect of NaCl and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 62, n. 6, p. 479-490, 1987. Doi:10.1111/j.1365-2672.1987.tb02680.x.

GUMUDAVELLI, V. et al. Dynamic Predictive Model for Growth of *Salmonella* Enteritidis in Egg Yolk. **Journal of Food Science**, v. 72, n.7, p. 254-262, 2007.

HAMADI, F.; ASSEME, F.; ELABED, S.; BENSOUDA, S.; MABROUKI, M.; LATRACHE, H. Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. **Food Control**, v. 38, n. 4, p. 104-108, 2014.

HARAN, K. P., S. M. GOODEN, D. BOXRUD, S. JAWAHIR, J. B. BENDER, AND S. SREEVATSAN. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. **Journal Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p.688-695, 2012.

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

COMBASE - Common Database for Predictive Microbiology Janeiro de 2016. Disponível em: <http://www.combase.cc>.

HAMADI, F.; ASSEME, F.; ELABED, S.; BENSOUDA, S.; MABROUKI, M.; LATRACHE, H. Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. **Food Control**, v. 38, n. 4, p. 104-108, 2014.

HARDY É, AZEVEDO F DE, MUNIZ CR. Pesquisa de *Salmonella* sp ., *Listeria* sp . e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do rio grande do norte. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, supl 0, p.1622–1655, 2003.

HUMPRHEY, T. J. Numbers of *Salmonella enteritidis* in the contents of naturally contaminated hens' eggs. **Epidemiology and Infections**, v. 106, n.3, p. 489-494, 1991.

JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Revue Scientifique et Technique**, v. 25, n.2, p. 571-580, 2006.

KADARIYA, J.; SMITH, T. C.; THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. **BioMed Research International**, p. 1-9, 2014. ID 827965.

KOWALIK, J.; LOBACZ, A. Development of a predictive model describing the growth of *Yersinia enterocolitica* in Camembert-type cheese. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 811–818, 2015.

LV, G.; XU, B.; WEI, P.; SONG, J.; ZHANG, H.; ZHAO, C.; QIN, L.; ZHAO, B. Molecular characterization of foodborne-associated *Staphylococcus aureus* strains isolated Shijiazhuang, China, 2010-2012. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 462-468, 2014.

LEE, G.Y.; JANG, H.I.; HWANG, I.G.; RHEE, M.S. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. **International Journal Food Microbiology**, v.134, n. 1, p.196-200, 2009.

LEITE, C. C. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em Queijo do tipo “Coalho” comercializado em Salvador (BA). Importância para a Saúde Pública. **Revista Analytica**, n. 02, p. 38-41, 2002.

LEITE JÚNIOR. A. F. S. Qualidade Microbiológica do queijo coalho comercializado à temperatura ambiente sob refrigeração, em Campina Grande – PB. **Revista Higiene Alimentar**, v. 14, n. 74, p. 53-59, 2000.

LIMA, A. N. A.; SIQUEIRA, C. M; SOARES, E. F.; ELIHIMAS, M. R. M.; SILVA, M. F. M. (2010). Queijo Coalho: Fabricação, Características Físicas e Comercialização Segura. Boas Práticas de Manipulação/Fabricação aplicadas na Comercialização de Queijos do Município de São Caetano-PE. X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010 – UFRPE: Recife, 18 a 22 de outubro. Disponível em: <http://www.sigeventos.com.br/jepex/inscricao/resumos/0001/R0243-3.PDF>. Acesso em 29/04/2016.

LIMA, M.H.P. Elaboração de queijo de coalho a partir de leite pasteurizado e inoculado com *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) 1996. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

LIN, Y. T.; LABBE, R. G.; SHETTY, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5672-5678, 2011.

LIU, F.; YANG, R. Q.; LI, Y. F. Correlations between growth parameters spoilage micro-organisms and self-life of pork stored under air and modified atmosphere at -2,4 and 10 °C. **Food Microbiology**, v. 23, n.6 p. 578-583, 2006.

LUZ, S. I., GOMES NETO, N. J., TAVARES, A. G., MAGNANI, M., & SOUZA, E. L. Exposure of *Listeria monocytogenes* to sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in a food-based medium does not induce direct or cross protection. **Food Research International**, v. 48, n.2, p. 667-672, 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Microbiologia de Brock. Traduzido de Brock Biology of Microorganisms. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAFFEI, D.F.; SILVEIRA, N.F.A.; CATANOZI, M.P.L.M. Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. **Food Control**, v.29, n.1, p.226-230, 2013.

MARTÍN, B.; PERICH, A.; GÓMEZ, D.; YANGÜELA, J.; RODRÍGUEZ, A.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T. Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. **Food Microbiology**, v. 44, p. 119-127, 2014. Doi:10.1016/j.fm.2014.05.014

MATTOS, M. R. et al.; Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. **Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 173-182, 2010.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos Processos Alimentares**. Editora Varela, São Paulos, SP, Brasil, 2005.

MEAD, P. S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG, L. F., BRESEE, J. S., SHAPIRO, C., et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**. v.5, n. 1, p.607- 625, 1999.

MEDEIROS JÚNIOR, F. C. **Viabilidade de culturas probióticas na fabricação de queijo coalho**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Agroalimentar). Centro de Ciências Humanas e Agrárias. Universidade Federal da Paraíba. 2011.

MELO, J.; ANDREW, P. W.; FALEIRO, M. L. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. **Food Research International**, v. 67, n. 1, p. 75-90, 2015.

MELO, F. D. et al. Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação, **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, p. 1152 , 2013. ISSN 1679-9216.

MENDES E. S.; MENDES P. P. DE; COELHO, M. I. S. DE et al. Avaliação sensorial de queijos de coalho elaborados com diferentes técnicas. **Higiene Alimentar**, v.16, n 100, p 59-65, 2002.

MENDES, E. S.; NUMERIANO, A. K. M.; COELHO, M. I. S. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes em queijos de “coalho” comercializados em Recife. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 66-67, p. 122, 1999.

MONTANHINI, M. T. M.; HEIN, K. K. Qualidade do leite cru comercializado informalmente no município de Pirai do sul, estado do Paraná, Brasil. **Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 393, p. 10-14, 2013.

MENESES, Roberta Barbosa de et al . O comércio de queijo de coalho na orla de Salvador, Bahia: trabalho infantil e segurança de alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 3, p. 381-392, 2012.

MILKA, C. D. A.; GRACE, B. D. S; FERNANDO, Z.; MAURICIO, C.H.; FRANCESCA, S.D.; MATEUS, M.D.C. Microbiological evaluation of raw milk and coalho cheese commercialised in the semi-arid region of Pernambuco, Brazil. **African of Journal Microbioly**, v.8, n.3, p.222–229, 2014.

MORIN-SARDIN, S. et al. Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. **Food Microbiology**, v. 56, p. 69–79, 2016.

MUNCK, A.V. Queijo de Coalho – Princípios básicos da fabricação (Palestra). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.59, n.339, p.13-15, 2004.

MUTHAIYAN, A.; RICKE, S. C.; GUSTAFSON, J. E. *Staphylococcus aureus* and understanding the factors that impact enterotoxin production in foods: A review. **Food Control**, DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.10.016, 2014.

NASSU, R. T. Diagnóstico das condições de processamento e caracterização físico-química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte / Renata Tieko Nassu. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, Embrapa Agroindústria Tropical. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, nº 11, p. 24, 2003.

NASSU, R. T; MOREIRA, C. G.; ROCHA, R.G. DE A.; FEITOSA, T.; BORGES, M. DE F.; MACEDO, A. A. M. Diagnóstico das condições de processamento e qualidade microbiológica de produtos regionais derivados do leite produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.55, p.121-126, 2000.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BEOTI, V.; BARROS, M. A.F; NETTO, O. P.; FRANCO, B.D.G.M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: Ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v 27, n. 1, p. 201-204, 2007.

NYCHAS, G. J. E. et al. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, v. 78, n. 1-2, p. 77-89, 2008.

OLIVEIRA, M. E. G. Queijo de coalho adicionado de bactérias lácticas: elaboração, caracterização e avaliação in vitro de potencial probiótico. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós- Graduação em Nutrição. 2013.

ORDÓÑEZ, J. A. Tecnologia dos alimentos: componentes dos alimentos e processo. Porto Alegre: Artmed, v.1, 2005a.

ORDÓÑEZ, J. A. O.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÀLVAREZ, L.F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F., PERALES, L. H; CORTECERO, M. D. S.
Queijos.In:Tecnologia de Alimentos. Alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, v.2, 2005b.

PAIVA, M.S.D.; CARDONHA, A.M.S. Queijo de coalho artesanal e industrializado produzidos no Rio Grande do Norte: estudo comparativo da qualidade micro-biológica. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 61, p.:33-37, 1999.

PEIXOTO, J. P. N. et al. Qualidade do ambiente e níveis de contaminação por micro-organismos em queijarias, no agreste paraibano. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.14, n.2, p.177-183, 2012. ISSN 1517-8595.

PAPAMICHALIS, P. et al. *Salmonella enteritidis* Infection Complicated by Acute Myocarditis. A Case Report and Review of the Literature. **Cardiology Research and Practice**, p. 6, 2011. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/574230>.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293 – 300, 2004.

POUILLOT, R.; LUBRAN, M.B. Predictive microbiology models vs. modeling microbial growth within *Listeria monocytogenes* risk assessment: what parameters matter and why. **Food Microbiology**, v.28, n. 4, p.720-726, 2011.

PSOMAS, A. N. et al. Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the growth of the food microorganisms under dynamic and static temperature conditions. **Computers Electronics in Agriculture**, v. 76, n.1, p. 119-129, 2011.

RAJKOVIC, A., SMIGIC, N.; DEVLIEGHERE, F. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* with prior resistance to intense pulsed light and lactic acid. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 869-872, 2011.

RATKOWSKY, D. A. et al. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n.1, p. 1-5, 1982.

RODRÍGUEZ F. P. et al. Modelling survival kinetics of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel surfaces soiled with different substrates under static conditions of temperature and relative humidity. **Food Microbiology**, v.5, n.2 p.197-204, 2013.

RODRIGUEZ – CATURLA. M. Y.; VALERO, D. A.; VALLEJO, J. L.; GARCIA-GIMENO R. M.; COSANO, G. Z. Effecto of pré-incubation condicions on growth and survival of *Staphylococcus aureus* in sliced cooked chicken breast. **Meat Science**, v. 92, n.4, p 409-416, 2012.

ROSS, T. MCMEEKIN, T. A. Modeling Microbial Growth Withen Food Safety Risk assessments. **Risk Analysis**, v. 23, n. 1, p. 20-26, 2003.

RUWER, C.M.; MOURA, J.F. DE; JACIREMA, M.; GONÇALVES, F. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos em Manaus , Amazonas (2005-2009): o problema do queijo coalho Outbreaks of Foodborne Diseases in Manaus, Amazonas (2005-2009): the problem of cheese curd. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p.60–66, 2011.

SAFE FOOD. The problem of antimicrobial resistance in the food chain. 2010. Disponível em: <<http://www.safefood.eu/SafeFood/files/8a/8abb9354-4cc2-49a4-b586-bf0008eb8cf.pdf>>. Acesso em 11 de Novembro de 2014.

SALOTTI, B.M. et al. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticaba. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.73, p. 171-175, 2006.

SANTANA, R. F.; SANTOS, D. M.; MARTINEZ, A. C. C.; LIMA, A. S. Qualidade microbiológica do queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1517-1522, 2008.

SANTOS, A. F. Aspectos microbiológicos de queijo tipo coalho comercializados em Fortaleza- ceará. **Centro de Pesquisa e Processamento de alimentos**, v. 13, n. 1, p. 31-36, 1995.

SCHVARTZMAN, M.S., MAFFRE, A., TENENHAUS-AZIZA, F., SANAA, M., BUTLER, F., JORDAN, K. 2011. Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurized or raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, Supplement 1, p.S31-S38, 2011.

SHEEN, S.; HWANG, C. A; JUNEJA, V. K. Modeling the impact of chlorine on the behavior of *Listeria monocytogenes* on ready- to-eat meats. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 1095-1100, 2011.

SILVA, M. C.D, RAMOS, A. C. S, MORENO I, MORAES J. O. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v.69, n.2, p.214-21, 2010.

SILVA, N. et al. Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bactéria. **Food Science and Technology International**, v. 19, n. 6, p. 503-510, 2013.

SILVA, R.A. et al. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1732-1738, 2012. ISSN 0102-0935.

SIRINAVIN, S. et al. Clinical and Prognostic Categorization of Extraintestinal nontyphoidal Salmonella infections in infants and children. **Clinical Infections and Diseases**, v. 29, n. 5, p. 1151-1156, 1999.

SOBOLEVA, T. K. Predictive microbiology and food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 183-192, 2000.

SOARES, K. D. A. et al. Microbiological and physicochemical quality of curd cheese sold in the state of Alagoas (Brazil). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 51-56, 2013.

SOLOMAKOS, N.; GOVARIS, A.; ANGELIDIS, A.S.; POURNARAS, S.; BURRIEL, A.R.; KRITAS, S.; PAPAGEORGIOU, D.K. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from raw bovine, caprine and ovine milk in Greece. **Food Microbiology**, v.26, n. 8, p.865-871, 2009.

SOUSA, A. Z. B. de et al. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivo do Instituto Biologia**, v.81, n.1, p. 30-35, 2014.

SOUZA, E. L.; BARROS, J. C.; OLIVEIRA, C. E. V.; CONCEIÇÃO, M. L. Influence of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in cheese: Feasibility study, processing, homogeneity the-art and future directions. **Clinical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 40-63, 2011.

SWINNEN, I. A. M. et al. Predictive modeling of the microbial lag phase: a review **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n 2, p 137-159, 2004.

TESHIMA E, VIANA A C, ASSIS MMS, FIGUEIREDO HM. Identidade e qualidade do queijo de coalho comercializado em Feira de Santana. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 59, n. 339, p. 194-198, 2004.

TIBÉRIO, M. L. Produtos tradicionais: importância socioeconômica na defesa do mundo rural. **1ª Jornada de Queijos e Enchidos** – Produtos Tradicionais. IAAS, EXPONOR, p. 1-13, 1998.

TREMARIN, A. Modelagem matemática do crescimento de *Byssoschamys fulva* e *Neosartaria fischeri* em suco e maçã solidificado sob condições isotérmicas e não isotérmicas. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, p. 217, 2015.

TSOLIS, R. M. et al. Minireview – How to become a Top Model. Impact of Animal Experimentation on Human *Salmonella* diseases research. **Infection and Immunity**, v. 79, n 5, p. 1806- 1814, 2011.

TURNER, C. W. Microbiology of ready-to-eat poultry products. In I. Guerrero-Legarreta, & Y. H. Hui (Eds.), Handbook of poultry science and technology Secondary processing Hoboken: John Wiley & Sons, v. 2, p. 507-515, 2010.

USDA (2016). Overview of predictive microbiology. Predictive Microbiology Information Portal. Disponível em: <http://portal.errc.ars.usda.gov/Overview.aspx>. Acesso em 11 Maio de 2016.

VIDAL, R. H. L. Diagnóstico Regional do Processo de Queijo Coalho Comercializado em Natal/ RN. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Mestrado em Engenharia Química. Linha de Pesquisa: Tecnologia em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal/RN 2011.

YAMAGUCHI, M.U et al. Qualidade microbiológica de alimentos e de ambientes de trabalho: pesquisa de *Salmonella* e *Listeria*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.6, n.3, p. 417-434, 2013.

WALLIN - CARLQUIST, N.; MÁRTA, D.; BORCH, E.; RÅDSTRÖM, P. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 69-74, 2010.

WHO. *Salmonella*. Disponível em: Acesso em: maio. 2016.

WHO. The burden of foodborne diseases is substantial. Disponível em:<http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodbornediseases/ferginfographics.pdf?ua=1>. Acesso em 11 de Maio de 2016.

WINK, M. Medicinal Plants: A Source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12771-12791, 2012.

ZELENY, R., EMTEBORG, H., CHAROUD-GOT, J., SCHIMMEL, H., NIA, Y., MUTEL, I., OSTYN, A., HERBIN, S., HENNEKINNE, J. A. Development of a reference material for *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in cheese: Feasibility study, processing, homogeneity and stability assessment. **Food Chemistry**, v. 168, p. 241-2, 2015. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.066.

ZILÁ A, SOUSA; B. DE, ABRANTES, M.R.; SAKAMOTO, S.M. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.81, n. 1; p.30–35, 2014.

ZINKE, C., M. WINTER, E. MOHR, AND V. KROMKER. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cheese produced in German farm-dairies. **Advances Microbiology**, v. 2, n. 4, p.629-633.2012.

ZWIETERING, M. H. Modeling bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1881-1887, 1990.

.

APÊNDICE

APÊNDICE – ARTIGO ORIGINAL

Predicting the growth of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* in coalho cheese

Running title: Predicting bacterial growth in coalho cheese.

Abstract

This study assessed the coalho cheese, a Brazilian minimally ripened cheese, as substrate for the growth of *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus* using temperature, pH and water activity (a_w) as controlling factors. Bacterial growth kinetics under different conditions of combined temperature, pH and a_w values determined in commercially available coalho cheese samples were predicted. The growth of three different *E. coli* strains was also modeled in commercial coalho cheese at 10 °C. The highest maximum growth rates (G_{max}) under the different experimental conditions of temperature, pH and a_w were predicted for the three pathogens: *L. monocytogenes* (G_{max} 0.01 – 0.07 log CFU/g/h), *Salmonella* spp. (G_{max} 0.01 – 0.04 log/CFU/g/h) and *S. aureus* (G_{max} < 0.01 – 0.05 log/CFU/g/h). The G_{max} of *E. coli* ranged from 0.01 – 0.03 log CFU/g/h. The temperature was the most influential parameter on the G_{max} of the four pathogens studied. The predicted G_{max} and lag time of the three tested *E. coli* strains in commercial coalho cheese at 10 °C ranged from 0.01 – 0.03 log CFU/g/h and 39.59 – 53.76 h, respectively. High R^2 values (≥ 0.97) were observed for growth curves by the model of Baranyi and Roberts in all tested *E. coli* strains. The prediction of growth kinetics as a function of temperature, a_w and pH in representative coalho cheese conditions was overall suitable for estimating the growth of *E. coli* in the commercially available product. These results demonstrate that coalho cheese is a favorable substrate for the growth of *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus*.

Keywords: minimally ripened cheese, bacterial growth, predictive models, microbial risk.

1. Introduction

Cheese is considered a potential vehicle for foodborne disease, especially fresh and minimally ripened handmade cheeses produced from raw milk (Pinto et al., 2009). Outbreaks linked to such cheeses produced with pasteurized milk, indicate that post-pasteurization contamination can also occur (Brooks et al., 2012; Quero et al., 2014). Foodborne disease associated with such cheeses is of concern for industry because of the resulting economic losses and the impact on human health (Gandhi and Chikindas, 2007). Different types of fresh and minimally ripened cheeses contaminated with a variety of different pathogens have been the cause of many outbreaks (Cody et al., 1999; De Buyser et al., 2001; Gould et al., 2014; Vitela et al., 2012).

Coalho is a semi-hard medium-to-high moisture cheese produced from raw or pasteurized cow or goat milk in various states in the northeast region of Brazil and sold throughout the country (Brazil, 1997; Queiroga et al., 2013). This cheese is produced by milk coagulation using rennet or coagulating enzymes, commonly complemented with selected lactic acid starter cultures, followed by a brief ripening period under cold temperatures that typically lasts no longer than 10 days (Brazil, 1997). Coalho cheese is of high commercial value because of its ease of production, high yield and wide consumer acceptance due to its mild acid taste and aroma (de Oliveira et al., 2014). This cheese is often consumed as a side dish, an ingredient in different preparations and in sandwiches.

Coalho cheese has high moisture content and relatively high pH, in contrast to ripened cheeses. These conditions may provide a suitable environment for the survival and growth of different pathogenic bacteria (de Carvalho et al., 2015). It lacks a standardized manufacturing process because much of its production is still performed in small dairies and farms using artisanal practices (Milka et al., 2014; Silva et al., 2012; Trajano et al., 2010). This means that different

commercially produced coalho cheeses often have widely different physicochemical and microbiological characteristics. Since raw milk and substandard food safety practices are still often associated with coalho cheese manufacture (Santana et al., 2008) this food may pose an unacceptable risk to consumers. Previous studies have found coalho cheese to be contaminated with *Escherichia coli*, *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus* and/or *Salmonella* spp. (Feitosa et al., 2003; Milka et al., 2014; Silva et al., 2012). Indeed, in these studies, *E. coli* has been the potentially pathogenic bacteria most frequently isolated from coalho cheese.

The intrinsic characteristics of cheeses (e.g, pH and water activity) as well as temperature will govern the behavior of their microbiota during ripening and storage (Lekas et al., 2006; Tiwari et al., 2014). The variability of these parameters in food matrices and the knowledge that pH, a_w and temperature may interact in complex ways to influence bacterial growth make the pathogen behavior potentially unpredictable (Schvartzman et al., 2011). Predictive models have been established for simulating microbial growth responses within a food matrix as a function of different factors (Schvartzman et al., 2011; Sutherland et al., 1994). However, more data on the responses associated with the growth of different strains of foodborne pathogens are still needed to improve the application of predictive growth models in food risk assessment (Lianou and Koutsomanis et al., 2011; Sant'Ana et al., 2012). Studies on the growth behavior and the influence of different environmental conditions on the growth of pathogens in coalho cheese are needed because of the association of such cheeses with pathogenic bacteria (Pinto et al., 2009; de Souza et al., 2016).

This study assesses coalho cheese as a substrate for the growth of the potentially pathogenic bacteria *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus* using temperature, pH and a_w as controlling factors. Bacterial growth kinetics under different conditions of combined temperature, pH and a_w values representative from commercial coalho cheese were predicted. The growth of different *E. coli* strains was also modeled in commercially available coalho cheese at 10

°C, and compared with the growth kinetic parameter predicted for *E. coli* in function of similar conditions of temperature, pH and a_w .

2. Material and methods

2.1 Cheese samples

One hundred samples of coalho cheese from ten different brands (ten samples from each brand; each sample was from a different batch) that were legally registered with the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply were purchased from local supermarkets (João Pessoa, Paraíba, Brazil). Each sample was approximately 500 g, and all samples were within the first 10% of shelf-life. Samples were checked for absence of visible signs of spoilage and maintenance of package integrity in the marketplace and for the absence of excessive slime and odor in the laboratory.

2.2 Determination of the temperature pH, and a_w of cheese samples

The temperature of the cheese samples in the marketplace was determined using an infrared thermometer (Model TCI1000, Incoterm, Porto Alegre, Brazil). The pH and a_w were measured in the laboratory using a digital potentiometer (Model 0400AS; Quimis®, Diadema, Brazil) and an Aqualab device (model CX-2 Water Activity System, Washington, USA), respectively, according to standard procedures (AOAC, 2005). The data obtained for each monitored parameter were organized in increasing order and expressed in frequency data as percentiles 25, 50, 75 and 90, and minimum and maximum values.

2.3 Data processing and the prediction of bacterial growth kinetics

The temperature, pH and a_w values were assessed in various combinations to assume representative conditions from commercial coalho cheese and to verify their effects as controlling factors on the growth kinetics of *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus*. The ComBase Predictor - static growth models (<http://modelling.combase.cc/>) was used to estimate the maximum growth rates (G_{max} ; log CFU/g/h). The predicted effects of the parameters on pathogen growth were estimated over 504 h (21 days). This time was selected because coalho cheese is commonly sold in market place within 21 days after manufacturing. The minimum temperature and a_w used for predictions of *E. coli* were 10 °C and 0.96, respectively; and the minimum a_w used for predictions of *Salmonella* spp. and *S. aureus* were 0.97 and 0.91, respectively. The ComBase Predictor models do not allow lower values for temperature and a_w to be selected.

2.4 *E. coli* growth modeling in coalho cheese

2.4.1 Bacterial strains and inoculum preparation

Three *E. coli* strains (ATCC 11303, ATCC 29214 and ATCC 25922), supplied by the Collection of Reference Microorganisms, National Institute for Control Quality in Health, Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil), were used as test organisms. These standard strains were selected due to the unavailability of *E. coli* strains recovered from coalho cheese or from coalho cheese processing environments with molecular characterization enough to guarantee their identity, purity and robust growth recommended to type of strains used in challenge tests (NACMCF challenge document, 2010). Each strain was adapted to a specific antibiotic to facilitate their recovery among the presence of background microflora in cheese when plated onto agar containing the same antibiotic. Gentamicin-resistant *E. coli* ATCC 11303 (EC_{gent}), nalidixic

acid-resistant *E. coli* ATCC 29214 (EC_{NA}) and streptomycin-resistant *E. coli* ATCC 25922 (EC_{Strept}) cultures were obtained by consecutive 24-h passages in Muller-Hinton broth (MHB, HiMedia, India) with increasing concentrations of gentamicin, nalidixic acid and streptomycin, respectively. The 24 h-passages were continued until the strains were resistant to 3 µg of gentamicin, 1 µg of nalidixic acid and 64 µg of streptomycin per mL of MHB. Growth and survival experiments using all of the *E. coli* resistant strains in MHB and in coalho cheese confirmed the stability of the induced resistance to each of the antibiotics, and that the *E. coli* resistant strains displayed a similar behavior as their respective parental strains.

Before inoculum preparation, EC_{gent}, EC_{NA} and EC_{Strept} were cultivated twice in MHB containing gentamicin 3 µg/mL, nalidixic acid 1 µg/mL or streptomycin 64 µg/mL, respectively, at 37 °C for 18 – 20 h. The cultures were then harvested by centrifugation (4500 *g*, 15 min, 4 °C), washed twice in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL) and re-suspended in sterile saline solution to obtain a cell suspension with an OD reading of 0.1 at 625 nm (OD₆₂₅). This suspension provided viable cell counts of approximately 6 log CFU/mL when plated onto Muller Hinton agar (MHA; HiMedia, India) supplemented with the respective antibiotic at its pre-established final concentration. The suspensions were diluted (1:100) in sterile saline solution to provide viable cell counts of approximately 4 log CFU/mL before use in assays of bacterial growth in cheese.

2.4.2 Preparation of coalho cheese samples, inoculation treatment and assessment of *E. coli* growth.

The cheese samples were aseptically removed from commercial packages, cut in slices of 25 g (approximately 3.8 cm width, 5.5 cm length and 1.1 cm height) on a sterile cutting glass tray using a flamed-sterilized stainless steel knife in a biosafety cabinet. Ten µL-aliquots of the test resistant *E. coli* strain suspension were dispensed evenly in ten different points onto the surface of the cheese sample, which was previously equilibrated overnight to the appropriate incubation

temperature. A total volume of 100 μL of bacterial suspension was inoculated in each cheese slice, comprising an initial count of approximately 3 log CFU/g. The cheese samples were kept in a biosafety cabinet for 20 min to allow for absorption of the bacterial suspensions and then placed in sterile propylene bags (volume 400 mL) that were hermetically closed and stored at 10 ± 0.5 °C. Enumeration of the inoculated *E. coli* resistant strain in the artificially contaminated cheese samples was made by suspending the respective cheese sample in 225 mL-sterile peptone water (0.1 g/100 mL) (1:9) and homogenizing the sample using a stomacher (Model A440, Marconi Equip. Lab. Ltda., Piracicaba, Brazil) for 3 min at room temperature at different storage time intervals (0 h – just after inoculation, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 1 d, 2 d, 3 d, 5 d, 7 d, 14 d and 21 d). Serial dilutions (10^{-2} – 10^{-7}) were performed using the same diluent, and 100 μL -aliquots from each dilution were spread plated onto MHA containing 3 $\mu\text{g/mL}$ of gentamycin, 1 $\mu\text{g/mL}$ of nalidixic-acid or 64 $\mu\text{g/mL}$ of streptomycin, and incubated aerobically at 37 °C for 48 - 72 h. The viable cells were counted after incubation, and the results were expressed as log CFU/g. Non-inoculated cheese samples were similarly tested as a control.

The growth of each *E. coli* resistant strain was assessed in three different cheese samples, and each assay was replicated three times. The cheese samples used in these assays had an average pH and a_w of 6.88 (± 0.26) and 0.96 (± 0.03), respectively. These values were determined using the same procedures described previously (item 2.2).

2.4.3 Modeling of the data

The data were modeled with primary models describing the growth kinetics over time. Microbial population densities were log-transformed and raw growth data were recorded in an Excel spreadsheet along with the time. The primary growth model of Baranyi and Roberts (1984) was fitted to the raw growth data by DMFit, a Microsoft Excel Add-In developed by the Institute

of Food Research (Norwich, UK), which calculated the estimates of the two kinetics parameters: Grmax (expressed in log CFU/g/h) and lag time (λ , expressed in hours). The Grmax obtained for each strain was compared with that predicted for *E. coli* in function of similar conditions of temperature, pH and a_w .

2.4.5 Statistical analysis

The Grmax and λ of the different *E. coli* strains were evaluated for differences using Analysis of Variance (ANOVA), followed by the Tukey post-hoc test. The results with $P \leq 0.05$ were considered significant. For the statistical analysis, the computational software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Prism Inc., California, USA) was used.

3. Results and discussion

3.1 The temperature, pH and a_w of commercially available coalho cheese

The distribution of temperature, pH and a_w that were evaluated in the commercial coalho cheese samples are presented in Table 1. At least 25% of the samples had a pick up temperature > 12 °C, which was above the cold storage conditions (≤ 12 °C) required by the Brazilian legislation for coalho cheese (Brazil, 1997). Most of the samples had a_w between 0.95 – 0.96 that characterized them as highly perishable (Ray and Bhunia, 2014). However, a minimum a_w value of 0.89, commonly found in hard/dehydrated cheeses (Ray and Bhunia, 2014), was detected in one sample. The majority of the samples had pH values between 6.06 - 7.00. In one sample a pH of 5.59 was observed.

3.2 Predicting the effect of temperature, pH and a_w on bacterial growth kinetics

The different combinations of temperature, pH and a_w representative of commercially available coalho cheese samples, and the estimated G_{max} of *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus* in function of these experimental conditions are shown in Table 2. *L. monocytogenes* G_{max} ranged from 0.01 – 0.07 log CFU/g/h, and for *Salmonella* spp. and *S. aureus*, G_{max} ranged from 0.01 – 0.04 and < 0.01 – 0.05 log CFU/g/h, respectively. The G_{max} of *E. coli* ranged from 0.01 – 0.03 log CFU/g/h. The G_{max} increased when the temperature increased rather than when the a_w and pH increased. This finding is in agreement with the available literature that recognizes temperature as a major environmental factor affecting microbial growth kinetics in foods (McMeekin et al., 2008). Not surprisingly, for the majority of cases where pH and a_w were combined with the lowest temperatures (7.8 and 8.5 °C, or 10 °C for *E. coli*), faster growth was predicted for *L. monocytogenes*. The psychrotrophic characteristics of *L. monocytogenes* enable this bacterium to grow at lower temperatures, which can increase post-processing foodborne disease risk in the ready to eat food (Tiwari et al., 2014). Under the conditions of 7.8 °C (or 10 °C), pH 5.59 and the lowest a_w value permitted for use in predictions of each bacteria, the faster growth was estimated for *Salmonella* spp. This may be related to the higher capacity of *Salmonella* to survive and keep growing better in foods with a lower a_w (Santillana Farakos et al., 2013). The predicted growth parameters indicated that faster growth of all studied pathogens may occur in temperatures ≥ 12.5 °C, even in combination with the lowest a_w and a pH as low as 5.59. Therefore, considering the distribution of temperatures verified among the assessed commercial coalho cheese samples (Table 1), at least 25% of these samples present higher risk to consumers. Considering the growth kinetic predicted under the experimental conditions tested in this study, the lowest detected temperatures (7.8, 8.5 or 10 °C for *E. coli*) in commercial coalho cheese samples might not prevent the growth of *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus*, regardless of the pH and a_w of the cheese.

The predicted growth models of *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus* over 504 h (21 days) as a function of a temperature of 8.5 °C (or 10 °C for *E. coli*) or 13.6 °C with distinct pH and a_w values are shown in Fig. 1 and Fig. 2, respectively. Considering the predicted growth models, if contamination of coalho cheese with any of these pathogens occurs, even in low levels, the bacterial population may increase during storage and reach high levels by the time of consumption, which will negatively influence the safety and stability of the product. At abusive storage temperatures (> 12 °C), the bacteria populations may increase prolifically and reach high levels in a much shorter time interval. At the tested abusive temperature (13.6 °C), regardless the pH and a_w , the predictions showed exponential growth of *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *Salmonella* spp. until nearly 216 h (9 days). Under the same temperature, a delayed growth was predicted for *E. coli*, although with final population level similar to those predicted for the other studied pathogens (Fig. 2). At the lower tested temperature, regardless of the pH and a_w , the predictions showed linear growth over time for all studied pathogens with the highest final population levels being estimated for *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. (Fig. 1).

The lower growth rates estimated for *E. coli* under the temperature, pH and a_w conditions representative from commercial coalho cheese do not mean absolutely that this bacterium impose lower risks than *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus*, because some serotypes of pathogenic *E. coli* (e.g., O157:H7) are capable of causing illness at very low doses (10 – 100 cells, or even lower in susceptible groups) (Lekkas et al., 2006). The exposure of these pathogens to other stressing factors, e.g., the cheese background microflora, which are not considered in the ComBase predictions, could also influence their growth overtime. Still, *L. monocytogenes* and *S. aureus* are commonly more susceptible than *E. coli* and *Salmonella* spp. to the inhibitory effects of indigenous lactic acid bacteria used as starter culture in cheese production (Abee et al., 1995).

The current Brazilian safety criterion for coalho cheese sets a maximum limit of 2 and 3 log CFU/g for coagulase-positive *Staphylococcus* and thermotolerant coliforms, respectively, and

the absence of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in 25 g at the end of the manufacturing process (Brazil, 2001). The European Commission has established food safety criteria for ready-to-eat products including minimally ripened cheese that states that *L. monocytogenes* and *S. aureus* should not exceed 2 log CFU/g at the end of shelf-life and at the end of the manufacturing process, respectively (EC No 2073/2005, 2008). This study shows that coalho cheese, as currently manufactured in Brazil may have pH and a_w characteristics that indicate that pathogenic bacteria may grow. This is further supported by the collected temperature data, which indicate that coalho cheese may not be stored at temperatures that prevent the growth of *Salmonella*, *S. aureus*, pathogenic *E. coli* and *L. monocytogenes*. These findings reinforce the idea that the Brazilian coalho cheese industry should adopt effective hygienic and sanitary practices to prevent contamination of coalho cheese by pathogenic *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus* during the manufacture, transport, market and handling to decrease the foodborne disease risk to the consumers. Moreover, refrigeration in Brazilian retail stores should be improved because exposure to abusive temperatures may speed the growth of pathogenic bacteria under the physicochemical conditions found in coalho cheese.

3.3 Modeling the growth of *E. coli* in coalho cheese

All of the *E. coli* strains tested were able to survive and grow in coalho cheese stored at 10 °C. Initial bacteria counts of approximately 3 log CFU/g reached final counts varying from 5.22 ($\pm$ 0.31) – 5.53 ($\pm$ 0.25) log CFU/g after 21 days of storage. Bacterial growth in food occurs when population increases are > 0.5 log CFU/g (Koutsoumanis and Sofos, 2005; Skandamis et al., 2009) or > 1 log CFU/g (NACMCF challenge document, 2010). These findings indicate that coalho cheese can support the growth of *E. coli* over time under storage temperatures commonly observed in the commercially available product.

The values of the average growth kinetic parameters for the three resistant *E. coli* strains in coalho cheese stored at 10 °C are shown in Table 3. The average R^2 -values for growth curves of all of the tested strains inoculated in coalho cheese were ≥ 0.97 , indicating a good fit of the data (Posada-Izquierdo et al., 2013; Sant'Ana et al., 2012). The EC_{gent} and EC_{Strept} presented lower ($P = 0.001$) Gr_{max} values (0.01 log CFU/g/h) than EC_{NA} (0.03 log CFU/g/h). EC_{NA} and EC_{Strept} presented higher ($P = 0.001$) λ values (53.76 and 52.15 h, respectively) than EC_{gent} (39.59 h). These results show that although the three strains presented similar ($P > 0.05$) final populations at the end of the assessed storage time interval, variations in the growth kinetics occurred. The EC_{gent} and EC_{Strept} grew slower than EC_{NA} , although EC_{gent} had taken less time to adapt to the conditions of the coalho cheese and begin to increase the population. The higher Gr_{max} of EC_{NA} may be related to the better ability of this strain to grow under the conditions found in tested coalho cheese samples because Gr_{max} is a particular characteristic of a microorganism or strain growing in a particular environment (Baranyi et al., 1995).

As seen in Table 2, the predicted Gr_{max} (0.01 log CFU/g/h) of *E. coli* under 10 °C (lowest temperature condition tested for this bacterium), a_w 0.96 and pH 6.77, was the same predicted for two out of the three tested *E. coli* strains in coalho cheese samples with similar physicochemical characteristics (pH 6.77 and a_w 0.96, Table 2) and storage at 10 °C. This indicates that the growth predictions at temperature, a_w and pH representative of commercial coalho cheese were generally suitable for predicting the growth of *E. coli* in this product. The difference in the final populations of *E. coli* predicted by the ComBase models (Fig. 2) and those predicted from data obtained in coalho cheese may be related to differences in microbial growth behavior in synthetic media and in food matrices. Bacteria growing in synthetic media are not exposed to specific characteristics of cheese, e.g., the solid structure, the background microflora, the lower oxygen diffusion and the presence of enzymes, peptides and organic acids (Chatelard-Chauvin et al., 2015; Martinez-Rios et al., 2016; Vernozzy-Rozand, et al., 2005), which would

affect the bacterial population levels overtime. The current literature does not report any studies on the growth behavior of *E. coli* in coalho cheese; however, early studies have verified the capacity of *E. coli* to survive and grow in other cheese products (Vernozy-Rozand et al., 2005; Govaris et al., 2001; Lekkas et al., 2006). It is noteworthy to cite that although this study has focused on the potential risks associated with the survival and growth of different potentially pathogenic bacteria in a typical Brazilian cheese, the employed approach may be useful to other products not previously assessed on these aspects.

4. Conclusions

The predictions obtained in this study demonstrated that temperature, pH and a_w values in commercially available coalho cheese in Brazil support the growth of *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus*. Among the tested growth controlling factors, temperature is most influential on the bacterial growth kinetics of the four pathogens studied. Overall, the highest G_{max} values are associated with the highest temperatures despite of the pH and a_w values. The challenge test showed that three different *E. coli* strains are capable of surviving and growing in coalho cheese at 10 °C, although variation in growth rates are evident. From this, suitable hygienic-sanitary practices are necessary to protect coalho cheese from contamination with *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus* during manufacture and marketing. These bacteria may grow in coalho cheese under storage temperatures commonly observed in Brazilian retailers, which exposes consumers to potential risk of foodborne disease.

Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) - Brazil for their financial support.

References

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International., 2005. 18th ed.
- Abee, T., Krockel, L., Hill, C. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. International Journal of Food Microbiology 28, 169-185.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Microbiology 23, 277-294.
- Baranyi, J., Robinson, T.P., Kaloti, A., Mackey, B.M. 1995. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. International Journal of Food Microbiology 27, 61-75.
- Bell, R.A., Hillers, V.N., Thomas, T.A. 1999. The Abuela Project: safe cheese workshops to reduce the incidence of *Salmonella typhimurium* from consumption of raw-milk fresh cheese. American Journal of Public Health 89, 1421-4.
- Brazil, 1997. Ministry of Agriculture and Supply. Ordinance No. 352 of 1997: approves technical regulation for the identity and quality of “coalho” cheese. Brasília, DF, Brazil: Diário Oficial da União. (in Portuguese).
- Brazil. Ministry of Health. National Health Surveillance Agency. RDC Resolution No. 12 of 02/01/2001. Technical Regulation on the Microbiological Standards for Foods.
- Brooks, J.C., Martinez, B., Stratton, J., Bianchini, A., Krokstrom, R., Hutkins, R., 2012. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. Food Microbiology 31, 154–158.
- Chatelard-Chauvin, C., Pelissier, F., Hullin, S., Montel, M.C. 2015. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw milk Cantal type cheeses during cheese making, ripening and storage in different packaging conditions. Food Control 54, 53-65, 2015.

- Cody, S.H., Abbott, S.L., Marfin, A.A, Schulz, B., Wagner, P., Robbins, K., Mohle-Boetani, J.C., Vugia, D.J. 1999. Two outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Northern California. The Journal of the American Medical Society 19, 1805-1810.
- De Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. International Journal of Food Microbiology 67, 1-17.
- de Carvalho, R.J., de Souza, G.T., Honório, V.G., de Sousa, J.P., da Conceição, M.L., Magnani, M., de Souza, E.L. 2015. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. Food Microbiology 52, 59-65.
- de Oliveira, M.E.G., Garcia, E.F., de Oliveira, C.E.V., Gomes, A.M.P., Pintado, M.M.E., Madureira, A.R.M.F., da Conceição, M.L., Queiroga, R.C.R.E., de Souza, E.L. 2014. Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. Food Research International 64, 241–247.
- de Souza, G.T., de Carvalho, R.J., de Souza, J.P., Tavares, J.F., Schaffner, D., de Souza, E.L., Magnani, M. 2016. Effects of the essential oil from *Origanum vulgare* L. on survival of pathogenic bacteria and starter lactic acid bacteria in semihard cheese broth and slurry. Journal of Food Protection 79, 246-252.
- EC 2008. European Commission Staff Working Document SANCO/1628/2008 Ver. 9.3 (26112008): *Listeria monocytogenes* shelf life studies for ready to eat foods, Under Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs.
- Ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/guidoc_listeria-monocytogenes_en.pdf

Feitosa, M.T., Borges, M.F., Nassu, R.T., de Azevedo, E.H.F., Muniz, C.R. 2003. Survey of *Salmonella* sp., *Listeria* sp. and hygienic-sanitary indicator microorganisms in cheese manufactured in the state of Rio Grande do Norte. Food Science and Technology 23, 162-16. (In Portuguese)

Food and Agriculture Organization and the World Health Organization. 2002. Risk Assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Food and Agriculture Organization and the World Health Organization. 2002. Risk assessments of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Gould, L.H., Mungai, E., Behraves, C.B. 2014. Outbreaks attributed to cheese: differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998–2011. Foodborne Pathogens and Disease 11, 545-551.

Govaris, A., Koidis, P., Papatheodorou, K. 2001. The fate of *Escherichia coli* O157:H7 in Myzithra, Anthotypos, and Manouri whey cheeses during storage at 2 and 12 °C. Food Microbiology 15, 565-570.

Koutsoumanis, K.P., Sofos, J.N. 2005. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 104, 83-91.

Lekkas, C., Kakouri, A., Paleologos, E., Voutisnas, L.P., Kontominas, M., Samelis, J. 2006. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 °C. Food Microbiology 23, 268-276.

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

- McMeekin, T., Bowman, J., McQuestin, O., Mellefont, L., Ross, T., Tamplin, M. 2008. The future of predictive microbiology: strategic research, innovative applications and great expectations. *International Journal of Food Microbiology* 128, 2-9.
- Martinez-Rios, V., Østergaard, N.B., Gkogka, E., Rosshaug, P.S., Dalgaard, P. 2016. Modelling and predicting growth of psychrotolerant pseudomans in milk and cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology* 216, 110-120.
- Milka, C.D.A., Grace, B.D.S., Fernando, Z., Mauricio, C.H., Francesca, S.D., Mateus, M.D.C. 2014. Microbiological evaluation of raw milk and coalho cheese commercialised in the semi-arid region of Pernambuco, Brazil. *African Journal of Microbiology Research* 8, 222–229.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). Parameters for determining inoculated pack/challenge study protocols. *Journal of Food Protection* 1, 140-202.
- Official Methods of Analysis of AOAC International - AOAC. 2012. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 18th ed. Washington. DC USA.
- Pinto, M.S., de Carvalho, A.F., Pires, A.C.S., de Paula, J.C.J., Sobral, D., Magalhães, F.A.R. 2009. Survival of *Listeria inocula* in Minas Traditional Serro cheese during ripening. *Food Control* 20, 1167-1170.
- Posada- Izquierdo, G.D., Pérez-Rodriguez, F., López-Gálvez, F., Allende, A.; Selma, A.V., Gil, M.I., Zurera, G. 2013. Modelling growth of *Escherichia coli* O157H:7 in fresh-cut lettuce submitted to commercial process conditions: chlorine washing and modified atmosphere packaging. *Food Microbiology* 33, 131-138.
- Queiroga, R.C.R.E., Santos, B.M., Gomes, A.M.P., Monteiro, M.J., Teixeira, S.M., Souza, E.L., Pereira, C.J.D., Pintado, M.M.E., 2013. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. *LWT - Food Science and Technology* 50, 538–544.

Quero, G.M., Santovito, E., Visconti, A., Fusco, V., 2014. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk and soft cheeses: Culture-independent versus liquid and solid-based culture-dependent real time PCR approaches. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 11-20.

Ray, B., Bhunia, A. *Fundamentals of Food Microbiology*. 5th Ed. CRC Press, Boca Raton. 577pp.

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

Santana, R.F., Santos, D.M., Martinez, A.C.C., Lima, A.S. 2008. Microbial quality of coalho cheese marketed in Aracajú, SE. *Brazilian Archives of Veterinary Medicine and Animal Science* 60, 1517-1522. (In Portuguese)

Santillana Farakos, S.M., Frank, J.F., Schaffner, D.W. 2013. Modelling the influence of temperature, water activity and water mobility on the persistence of *Salmonella* in low-moisture foods. *International Journal of Food Microbiology* 166, 280-293.

Schvartzman, M.S., Maffre, A., Tenenhaus-Aziza, F., Sanaa, M., Butler, F., Jordan, K. 2011. Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurized or raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 145, S31-S38.

Schvartzman, M.S., Maffre, A., Tenenhaus-Aziza, F., Sanaa, M., Butler, F., Jordan, K. 2011. Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurized or raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 145, S31-S38, 2011.

Silva, R.A., Bismara, P.A., Moura, R.B., Lima Filho, J.L., Porto, A.L.F., Cavalcanti, M.T.H. 2012. Evaluation of the bacterial microbiota of artisanal coalho cheese manufactured in Agreste region of the state of Pernambuco. *Brazilian Archives of Veterinary Medicine and Animal Science* 64, 1732-1738. (In Portuguese)

- Skandamis, P.N., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., Belk, K.E., Scanga, J.A., Smith, G.C., Sofos, J.N. 2007. Modelling the effect of inoculum size and acid adaptation on growth/non growth interface of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 120, 237-249.
- Sutherland, J.P., Bayliss, A.J., Roberts, T.A. 1994. Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology* 21, 217-236.
- Tiwari, U., Walsh, D., Rivas, L., Jordan, K., Duffy, G. 2014. Modelling the interaction of storage temperature, pH, and water activity on the growth behavior of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurised semi-soft rind washed milk cheese during storage following ripening. *Food Control* 42, 248-256.
- Torres-Vitela, M.R., Mendoza-Bernardo, M., Castro-Rosas, J., Gomez-Aldapa, C.A., Garay-Martinez, L.E., Navarro-Hidalgo, V., Villarruel-López, A. 2012. Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Staphylococcal* enterotoxin in two types of Mexican fresh cheeses. *Journal of Food Protection* 75, 79-84.
- Trajano, V.N.; Lima, E.O., de Souza, E.L., Travassos, A.E.R. 2010. Inhibitory effect of the essential oil from *Eugenia caryophyllata* Thumb leaves on coalho cheese contaminating microorganisms. *Food Science and Technology* 30, 1001-1006.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy-Cruchaudet, C., Bavai, C., Montet, M.P., Bonin, V., Dernburg, A., Richard, Y. 2005. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 105 83-88.

Table 1. The percentile and maximum and minimum values of temperature, pH and water activity (a_w) determined in commercial coalho cheese samples (n = 100).

Parameters	Percentile				Minimum - Maximum
	Percentile 25	Percentile 50	Percentile 75	Percentile 90	
Temperature (°C)	8.6	10.8	12.5	13.6	7.8 – 13.8
pH	6.06	6.40	6.77	7.00	5.59 – 7.13
a_w	0.95	0.95	0.96	0.96	0.89 – 0.97

Table 2. The predicted maximum growth rate - Grmax (log CFU/g/h) of *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus* in coalho cheese under different combinations of temperature, pH and a_w (percentile 25, 50, 75 and 90, and minimum and maximum values) determined in commercial coalho cheese samples. The predictions were obtained using ComBase Predictor – static growth models (<http://modelling.combase.cc/>).

Conditions			Microorganisms			
Temperature (°C)*	pH	a_w **	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. aureus</i>
			Grmax	Grmax	Grmax	Grmax
Combination of percentile 25, 50, 75 and 90						
8.5	5.90	0.95	NT	0.01	NT	0.01
8.5	5.90	0.97	NT	NT	0.01	NT
8.5	5.90	0.96	0.01	0.02	NT	0.01
10.0	5.90	0.96	0.01	NT	NT	NT
10.8	5.90	0.95	NT	0.02	NT	0.02
10.8	5.90	0.97	NT	NT	0.02	NT
12.5	5.90	0.95	NT	0.02	NT	0.02
12.5	5.90	0.97	NT	NT	0.03	NT
13.6	5.90	0.95	0.02	0.03	NT	0.03
8.5	6.06	0.95	NT	0.01	NT	0.01
8.5	6.06	0.97	NT	NT	0.01	NT
10.0	6.06	0.96	0.01	NT	NT	NT
10.8	6.06	0.95	NT	0.02	NT	0.02
10.8	6.06	0.97	NT	NT	0.02	NT
12.5	6.06	0.95	NT	0.03	NT	0.03
12.5	6.06	0.97	NT	NT	0.03	NT
13.6	6.06	0.95	NT	0.03	NT	0.03
13.6	6.06	0.97	NT	NT	0.04	NT
10.8	5.90	0.96	NT	0.02	NT	0.02
12.5	5.90	0.96	0.01	0.03	NT	0.03
12.5	5.90	0.97	NT	NT	0.03	NT
13.6	5.90	0.96	0.02	0.04	NT	0.04
13.6	5.90	0.97	NT	NT	0.03	NT
8.5	6.06	0.96	NT	0.02	NT	0.01
10.8	6.06	0.96	0.01	0.03	NT	0.02
12.5	6.06	0.96	0.01	0.04	NT	0.03
13.6	6.06	0.96	0.02	0.04	NT	0.04
8.5	6.39	0.96	NT	0.02	NT	0.01
8.5	6.39	0.97	NT	NT	0.01	NT

10.0	6.39	0.96	0.01	NT	NT	NT
10.8	6.39	0.95	NT	0.02	NT	0.02
10.8	6.39	0.96	0.01	0.03	NT	0.02
10.8	6.39	0.97	NT	NT	0.02	NT
12.5	6.39	0.95	NT	0.03	NT	0.03
12.5	6.39	0.96	0.02	0.04	NT	0.03
12.5	6.39	0.97	NT	NT	0.03	NT
13.6	6.39	0.95	NT	0.04	NT	0.04
13.6	6.39	0.96	0.02	0.05	NT	0.04
13.6	6.39	0.97	NT	NT	0.04	NT
8.5	6.39	0.95	NT	0.01	NT	0.01
10.0	6.39	0.96	0.01	NT	NT	NT
8.5	6.77	0.96	NT	0.02	NT	0.01
8.5	6.77	0.97	NT	NT	0.01	NT
10.0	6.77	0.96	0.01	NT	NT	NT
8.5	6.77	0.95	NT	0.02	NT	0.01
10.8	6.77	0.95	NT	0.02	0.02	0.02
10.8	6.77	0.96	0.01	0.03	NT	0.02
10.8	6.77	0.97	NT	NT	0.02	NT
12.5	6.77	0.95	NT	0.03	NT	0.03
12.5	6.77	0.96	0.02	0.04	NT	0.03
12.5	6.77	0.97	NT	NT	0.03	NT
13.6	6.77	0.96	0.02	0.05	NT	0.04
13.6	6.77	0.97	NT	NT	0.04	NT

Combination of maximum and minimum values

7.8	5.59	0.89	NT	0.01	NT	NT
7.8	5.59	0.91	NT	NT	NT	< 0.01
10.0	5.59	0.96	0.01	NT	NT	NT
7.8	5.59	0.97	NT	0.01	0.01	0.01
7.8	7.13	0.96	0.01	NT	NT	NT
7.8	7.13	0.89	NT	0.01	0.01	NT
7.8	7.13	0.91	NT	NT	NT	< 0.01
7.8	7.13	0.97	NT	0.02	0.01	0.01
10.0	7.13	0.96	0.01	NT	NT	NT
13.8	5.90	0.89	0.01	0.02	NT	NT
13.8	5.90	0.91	NT	NT	NT	0.02
13.8	5.90	0.96	NT	NT	0.04	NT
13.8	5.90	0.97	0.02	0.05	0.04	0.05
13.8	7.13	0.89	NT	0.02	NT	NT

13.8	7.13	0.91	NT	NT	NT	0.02
13.8	7.13	0.96	NT	NT	0.04	NT
13.8	7.13	0.97	0.03	0.07	0.04	0.04

*Minimum value of temperature permitted by Combase Predictor for use in the predictions of *E. coli*: 10 °C; ** Minimum value of a_w permitted by Combase Predictor for use in the predictions of *E. coli*, *Salmonella* spp. and *S. aureus*: 0.96, 0.97 and 0.91, respectively.

NT: condition not tested because the temperature or a_w are lower than the minimum permitted for use by the Combase Predictor.

Table 3. The predicted maximum growth rate (Grmax) and lag time (λ) of different *E. coli* strains in coalho cheese stored at 10 ± 0.5 °C.

Strain	Growth kinetic parameters		R ²
	Grmax (log CFU/g/h)	λ (h)	
EC _{gent}	0.01 (± 0.003) ^a	39.59 (± 2.53) ^a	0.98
EC _{NA}	0.03 (± 0.004) ^b	53.76 (± 3.22) ^b	0.97
EC _{Sptret}	0.01 (± 0.001) ^a	52.15 (± 4.10) ^b	0.98

EC_{gent}: *E. coli* ATCC 11303 resistant to gentamicin; EC_{NA}: *E. coli* ATCC 29214 resistant to nalidixic acid; *E. coli* ATCC 25922 resistant to streptomycin; ^{a - b} Different superscript letters in the same column indicate a difference ($P \leq 0.05$) among the data, based on the Tukey test.

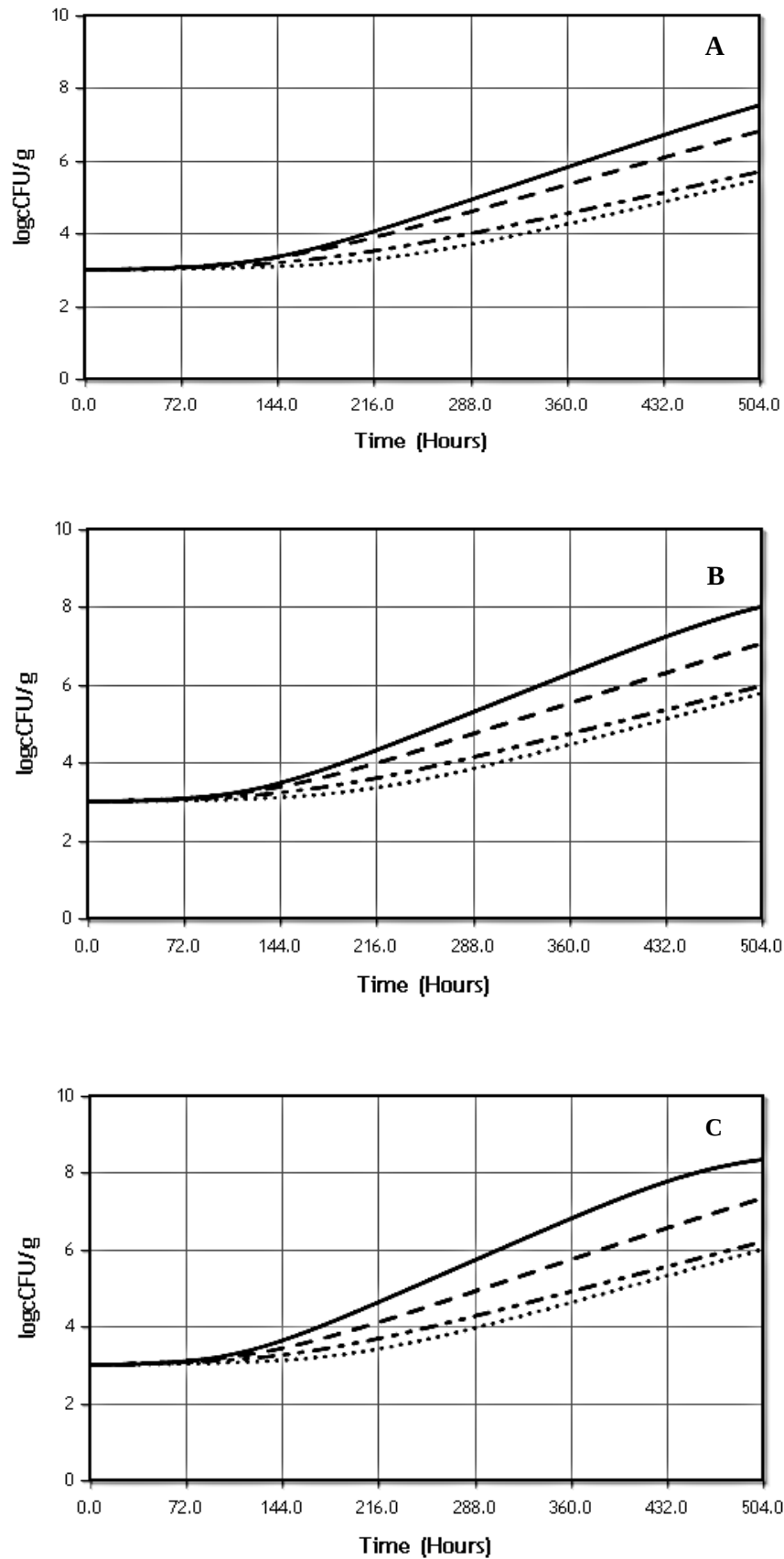


Figure 1. The predicted growth models of *E. coli* (— · —), *L. monocytogenes* (—), *Salmonella* spp. (— —) and *S. aureus* (.....) under different conditions of temperature, pH and a_w (A): 8.5 °C, pH 5.9 and a_w 0.95 for *L. monocytogenes* and *S. aureus*; 8.5 °C, pH 5.9 and a_w 0.97 for *Salmonella* spp.; and 10 °C, pH 5.9 and a_w 0.96 for *E. coli*; (B): 8.5 °C, pH 6.77 and a_w 0.96 for *L. monocytogenes* and *S. aureus*; 8.5 °C, pH 6.77 and a_w 0.97 for *Salmonella* spp.; and 10 °C, pH 6.77 and a_w 0.96 for *E. coli* (C): 8.5 °C, pH 6.39 and a_w 0.95 for *L. monocytogenes* and *S. aureus*; 8.5 °C, pH 6.39 and a_w 0.97 for *Salmonella* spp.; and 10 °C, pH 6.39 and a_w 0.96 for *E. coli*. The predictions were obtained using ComBase models (<http://modelling.combase.cc/>).

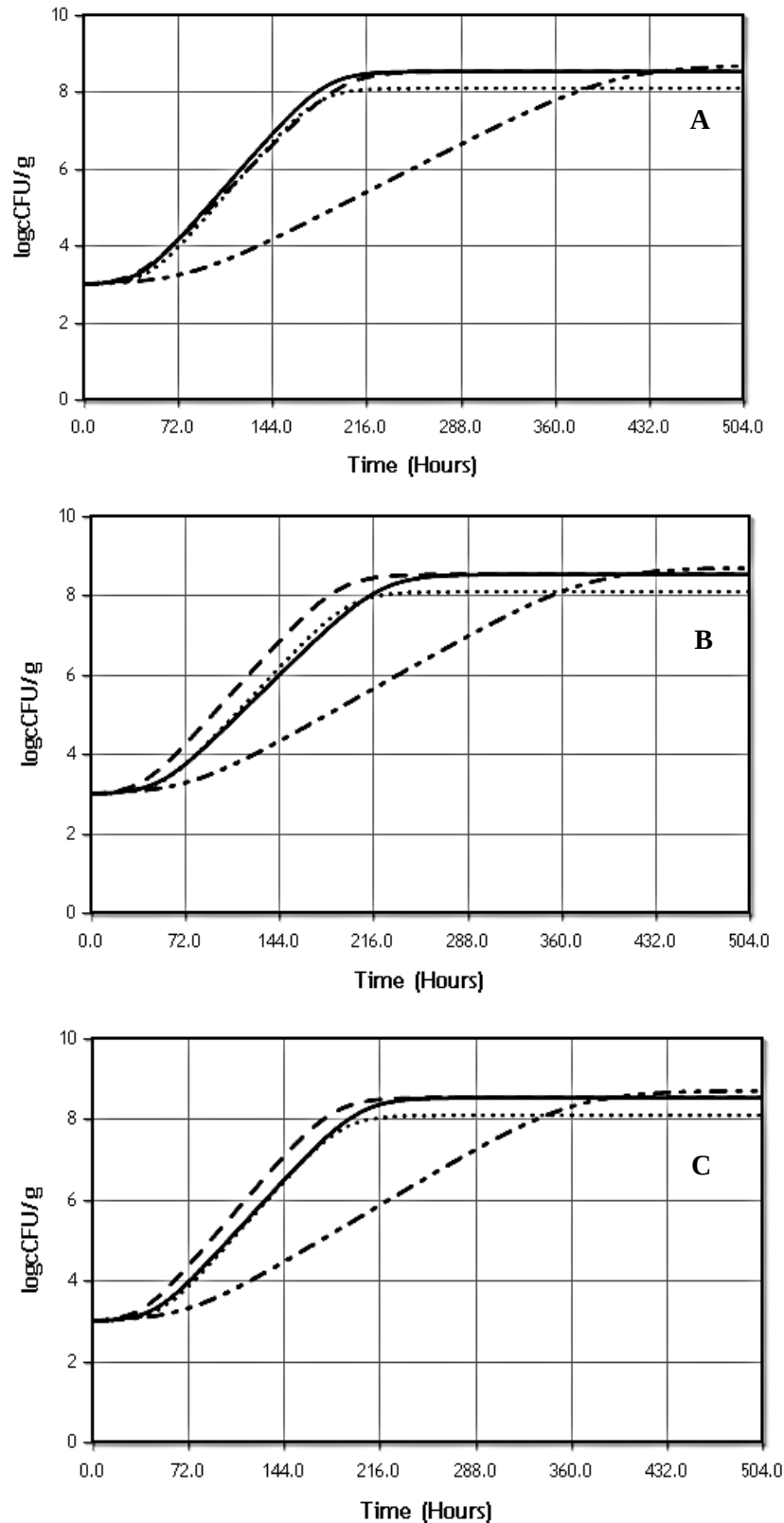


Figure 2. The predicted growth models for *E. coli* (---), *L. monocytogenes* (—), *Salmonella* spp. (- · -) and *S. aureus* (·····) under different conditions of temperature, pH and a_w . (A): 13.6 °C, pH 5.9 and a_w 0.96 for *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*, and 13.6 °C, pH 5.9 and a_w 0.97 for *Salmonella* spp.; (B): 13.6 °C, pH 6.06 and a_w 0.96 for *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*, and 13.6 °C, pH 6.06 and a_w 0.97 for *Salmonella* spp.; and (C): 13.6 °C, pH 6.39 and a_w 0.96 for *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*, and 13.6 °C, pH 6.39 and a_w 0.97 for *Salmonella* spp. The predictions were obtained using ComBase models (<http://modelling.combase.cc/>).