



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

**Avaliação do comportamento de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* em  
Preparações Gastronômicas à Base de Ovos e Peixes**

DANIELLE CARMO DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Porto Alegre

2023

Danielle Carmo da Silva

**Avaliação do comportamento de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* em  
Preparações Gastronômicas à Base de Ovos e Peixes**

Tese de doutorado apresentado ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

**PORTO ALEGRE**

**2023**

## CIP - Catalogação na Publicação

Carmo da Silva, Danielle

Avaliação do comportamento de Salmonella e Listeria monocytogenes em Preparações Gastronômicas à Base de Ovos e Peixes / Danielle Carmo da Silva. -- 2023.  
129 f.

Orientador: Eduardo Cesar Tondo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Microbiologia. 2. Gastronomia. 3. Patógenos. 4. Segurança. 5. Boas Práticas. I. Cesar Tondo, Eduardo, orient. II. Título.

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

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

Autora: Danielle Carmo da Silva (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Título da tese: Avaliação do comportamento de *Salmonella* e *Listeria  
monocytogenes* em Preparações Gastronômicas à Base de Ovos e Peixes

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

Aprovada em: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Comissão Examinadora

---

Prof. Dra. Patrícia da Silva  
Malheiros

Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul

---

Prof. Dra. Elis Regina  
Gomes Alfama

Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do  
Sul

---

Prof. Dra. Roberta Flogiatto  
Mariot

Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul

## RESUMO

Preparações à base de ovos e peixes são amplamente utilizadas na gastronomia, devido as suas versatilidades. Entretanto, preocupações quanto à segurança dessas preparações ocorrem com frequência, uma vez que essas matérias-primas podem estar contaminadas por *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, principalmente se servidas sem tratamento térmico adequado, como ocorre em algumas receitas. Com o objetivo de aumentar a segurança de preparações em serviços de alimentação, diferentes órgãos reguladores exigem o processamento térmico de todas as partes do alimento a 70°C ou mais. Contudo, nem sempre isso ocorre em receitas que contém ovos e peixes, as quais são servidas cruas ou com tratamentos térmicos brandos (<70°C), com o intuito de obter diferentes sabores e texturas. O presente estudo tem como objetivo analisar o comportamento de patógenos alimentares nas preparações gastronômicas escolhidas neste contexto. Para tanto, foi analisado o comportamento de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, em três diferentes preparações à base de ovos e peixes, a fim de compor uma composição de menu possivelmente consumida em restaurante de gastronomia (um prato salgado: ceviche, um prato doce: *tiramisù* e uma bebida: *eggnog*). Além desses estudos, foi realizada uma publicação de um capítulo de livro sobre segurança de pescados. Para as preparações envolvendo ovos, *eggnog* e *tiramisù*, um *pool* de *Salmonella* foi inoculado em ovos de galinha, os quais foram incubados a 37°C, e a população bacteriana atingiu 8 a 8,5 log UFC/g. Os ovos contaminados foram utilizados nas preparações. No *eggnog*, as gemas contaminadas foram utilizadas para compor uma bebida com 0,4% ABV, pH 6,31 e 7,40 log UFC/ml de *Salmonella*, e foi testada em três cenários diferentes (A: sem nenhum tratamento térmico; B: com tratamento térmico brando (70°C); C: com tratamento térmico elevado (80 e 70°C)). As amostras foram coletadas em diferentes momentos após a adição de rum a 5°C e após 24 h a 25°C. Os resultados microbiológicos demonstraram que o cenário A não houve redução significativa de *Salmonella*. No cenário B, as contagens foram reduzidas em aproximadamente 2,6 log UFC/ml. E o *eggnog* preparado de acordo com o cenário C demonstrou reduções de *Salmonella* de mais de 5 log UFC/ml. Após armazenamento a 25°C, por 24 h, as contagens de *Salmonella* atingiram 8,39, 8,40 e 4,34 log UFC/ml nos cenários A, B e C, respectivamente. Com base nos resultados, sugere-se que a forma segura de consumir a bebida *eggnog* seja adquirir ovos provenientes de indústrias de boa qualidade (inspecionadas por órgãos regulamentadores), prepará-la com elevado tratamento térmico (até 80 e posteriormente a 70°C) e consumir imediatamente. No outro estudo, as gemas contaminadas foram utilizadas para a elaboração da sobremesa *tiramisù* por quatro métodos (1: controle - sem bebida alcoólica e nenhum tratamento térmico aplicado; 2: gema de ovo crua em contato com a bebida alcoólica – rum - por 30 min; 3: com calda de açúcar aquecida a 90°C e adicionada à gema; 4: com calda de açúcar, porém aquecida a 121°C). Após o preparo das receitas, elas foram resfriadas a 5°C e as amostras foram coletadas em diferentes tempos. A sobremesa preparada de acordo com a receita 3 demonstrou reduções de *Salmonella* superiores a 6 log UFC/g. No entanto, após 120 h de armazenamento a 5°C, *Salmonella* voltou a multiplicar, atingindo 4,64 log UFC/g. O método que foi capaz eliminar as contagens de *Salmonella* na gema contaminada foi o 4 (calda a 121°C), porém visualmente foi possível observar uma alteração na textura das gemas. Em

conclusão, o Método 4 foi o único capaz de inativar *Salmonella* de gemas de ovo contaminadas e pode ser utilizado em restaurantes e residências como alternativa em servir *tiramisù* seguro para o consumo. Entretanto, é necessário verificar a aplicabilidade desta alteração junto a *chefs*, uma vez que este método pode levar a uma alteração no aspecto sensorial final da sobremesa. Na avaliação da preparação de ceviche, um *pool* de *Listeria monocytogenes* (LM) foi inoculado em cubos de tilápia crua, atingindo aproximadamente 8-9 log UFC/g, para preparar a receita clássica de ceviche, em diversos tempos de marinação e armazenamento refrigerado (<4°C). Também foi testado outros tratamentos, somente na tilápia crua contamina com LM, aplicando suco de limão (SL) e tratamento térmico com *sous vide* (SV) das seguintes formas: LJ; SV; LM+SV; SV+LM. Os resultados apresentaram reduções de LM na preparação ceviche, desde os primeiros tempos de marinação ( $_{1/2}h$  - 0.95 log CFU/g), até reduções significativas (120h - 3.34 log UFC/g). Nos tratamentos alternativos aplicados na tilápia, os resultados também demonstraram reduções significativas ( $p \leq 0.05$ ) de 1,9, 1,35, 3,04, 0,86 e 3,18 log UFC/ g em LJ, LJ+SV, SV e SV+LJ, respectivamente. Contudo, nenhum tratamento foi capaz de inativar completamente LM e/ou reduzir as contagens em <2 log UFC/g. Em conclusão, outros métodos devem ser considerados e analisados em estudos futuros para tentar a inativação completa de LM ou reduções que atinjam contagens <2 log UFC/g, uma vez que LM é um patógeno com alta taxa de letalidade mesmo com baixa incidência. O capítulo de livro sobre pescados, apresentou a importância do uso de pescados na gastronomia, abordando os principais perigos, inclusive a contaminação biológica por diversos patógenos como por exemplo *Vibrio parahaemolyticus* e *Listeria monocytogenes*, e descreveu dicas práticas com base em artigos científicos para a compra, armazenamento, preparo, serviço e transporte de pescados e pratos envolvendo pescados, na gastronomia. Portanto, este estudo evidenciara a relevância da aplicação de tratamento térmico adequado e das boas práticas em serviços de alimentação na mitigação da contaminação por *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* em preparações culinárias à base de ovos e peixes. Tais achados contribuem para a segurança dos alimentos, propiciando a adoção de práticas mais seguras no contexto gastronômico.

**Palavras-chave:** Gastronomia; Patógenos; *Salmonella*; *Listeria monocytogenes*.

## ABSTRACT

Preparations based on eggs and fish are widely used in many gastronomic preparations, due to their versatility. However, concerns about the safety of these preparations frequently occur, since these raw materials may be contaminated by *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*, especially if served without adequate heat treatment, as occurs in some gastronomic preparations. In order to increase the safety of many preparations, different regulatory agencies require thermal processing of all parts of the food at 70°C or more, however this does not always occur in gastronomic preparations that contain eggs and fish, which are served raw or with mild heat treatments, in order to obtain different flavors and textures. The present study aims to analyze the behavior of foodborne pathogens in gastronomic preparations chosen in this context. Therefore, the behavior of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* will be analyzed in three different preparations based on eggs and fish, in order to compose a menu possibly consumed in a gastronomy restaurant (savory dish: ceviche, dessert: *tiramisù* and a beverage: eggnog). In addition to these studies a book chapter about fish safety was carried out. Two of the preparations have been studied so far: eggnog and *tiramisù*. For the studies, a pool of *Salmonella* was inoculated into the eggs, which were incubated at 37°C, reaching 8 to 8.5 log CFU/g. The contaminated eggs were used in the preparations. In eggnog, the contaminated yolks were used to compose a drink with 0.4%ABV, pH 6.31 and 7.40 log CFU/ml of *Salmonella* and studied in three different scenarios (A: without any heat treatment; B: mild heat treatment (70°C); C: high heat treatment (70 and 80°C). Samples were collected at different times after the addition of rum at 5°C and after 24 h at 25°C. Microbiological results demonstrated that scenario A did not show a significant reduction in *Salmonella*. In scenario B, counts were reduced by approximately 2.6 log CFU/ml. Eggnog prepared according to scenario C demonstrated reductions of over 5 log CFU/ml. After storage at 25°C for 24 hours, *Salmonella* counts reached 8.39, 8.40, and 4.34 log CFU/ml in scenarios A, B, and C, respectively. Based on the results, it is suggested that the safe way to consume the eggnog drink is to buy eggs from good quality energy sources, prepare them with high heat treatment and consume them immediately. In the other study, the contaminated egg yolks were used in the preparation of *tiramisù* dessert by four methods (1: control - no alcoholic beverage and no heat treatment applied; 2: raw egg yolk in contact with alcoholic beverage (rum) for 30 minutes; 3: with sugar syrup heated to 90°C and added to the egg yolk; 4: with sugar syrup, but heated to 121°C). After the recipes were prepared, they were cooled to 5°C, and samples were collected at different time intervals. The dessert prepared according to recipe 3 demonstrated *Salmonella* reductions exceeding 6 log CFU/g. However, after 120 hours of storage at 5°C, *Salmonella* started to multiply, reaching 4.64 log CFU/g. The method that completely eliminated *Salmonella* in the contaminated egg yolks was method 4 (sugar syrup at 121°C). However, a visual alteration in the appearance of the yolks was observed. In conclusion, method 4 was the only one capable of completely inactivate *Salmonella* in contaminated egg yolks and can be used in restaurants and homes as an alternative to serving safe *tiramisù*. However, it is necessary to verify the applicability of this alteration with chefs, as this method may lead to a change in the final sensory aspect of the dessert. In the evaluation of ceviche preparation, a pool of *Listeria monocytogenes* (LM) was inoculated into raw tilapia cubes,

reaching approximately 8-9 log CFU/g, to prepare the classic ceviche recipe at various marination and refrigerated storage times (<4°C). Other treatments were also tested, only applied to the raw tilapia contaminated with LM, involving the use of lemon juice (LJ) and sous vide (SV) heat treatment in the following forms: LJ; SV; LM+SV; SV+LM. The results showed LM reductions in the ceviche preparation from the early marination times (1/2 hour - 0.95 log CFU/g) to significant reductions (120 hours - 3.34 log CFU/g). In the alternative treatments applied to tilapia, significant reductions ( $p \leq 0.05$ ) of 1.9, 1.35, 3.04, 0.86, and 3.18 log CFU/g were observed in LJ, LJ+SV, SV, and SV+LJ, respectively. However, no treatment completely inactivated LM or reduced counts to <2 log CFU/g. In conclusion, other methods should be considered and analyzed in future studies to attempt complete inactivation of LM or reductions below <2 log CFU/g, as LM is a pathogen with a high fatality rate even with low incidence. The book chapter on seafood presented the importance of seafood in gastronomy, addressing the main hazards, including biological contamination by various pathogens such as *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes*. It also described practical tips based on scientific articles for the purchase, storage, preparation, service, and transportation of seafood and dishes involving seafood in gastronomy. In summary, the results of this study underscore the importance of applying adequate heat treatment and good practices in food service establishments to mitigate contamination by *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in culinary preparations involving eggs and fish. These findings contribute to food safety, promoting the adoption of safer practices in the culinary context.

**Keywords:** Gastronomy; Pathogens; *Salmonella*; *Listeria monocytogenes*.



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	10
2.	OBJETIVOS .....	13
2.1	Objetivo Geral.....	13
2.2	Objetivos Específicos .....	13
3.	CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
3.1	Restaurantes e Gastronomia.....	14
3.2	<i>Salmonella enterica</i> .....	15
3.3	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	16
3.4	Menu.....	18
4.4.1	Ceviche .....	18
4.4.2	<i>Tiramisù</i> .....	19
4.4.3	<i>Eggnog</i> .....	19
3.5	Legislação.....	19
3.6	Análise Diagnostica de Microbiota via MALDITOF-TOF/MS .....	21
3.7	Capítulos .....	22
4.	CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1 .....	23
5.	CAPÍTULO 3 – ARTIGO 2 .....	40
6.	CAPÍTULO 4 – ARTIGO 3 .....	57
7.	CAPÍTULO 5 – CAPÍTULO DE LIVRO .....	78
8.	CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO GERAL.....	108
9.	CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	118
10.	REFERÊNCIAS .....	121

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	88
---------------	----

## 1. INTRODUÇÃO

Na gastronomia, os restaurantes de alto padrão são locais onde são preparadas refeições de qualidade executadas por um *chef* (SUNDQVIST, 2023; ZANONI, 2012) e objetivam proporcionar experiências gastronômicas únicas aos seus clientes. O conhecimento do *chef* permite, muitas vezes, a elaboração de pratos autorais, com uso de técnicas não convencionais, utilização de novos ingredientes, aplicando técnicas culinárias locais ou estrangeiras. Esse conhecimento também permite explorar ingredientes através de uma ampla gama de funções, como é o caso dos ovos, com os quais é possível formar espumas, emulsões e espessar demais preparações; ou explorar algumas matérias-primas perecíveis, como é o caso dos peixes, fornecendo novas texturas, sabores e aromas (AGUILERA, 2013; O'DEA; HEWSON, 2015; SOUZA *et al.*, 2007).

Devido a sua versatilidade, ovos e peixes são amplamente consumidos em todo o mundo, podendo ser preparados em altas ou baixas temperaturas, por longos ou curtos períodos, assim como podem ser utilizados crus (KATZ, 2014; O'DEA; HEWSON, 2015; SOUZA *et al.*, 2007). Os ovos e os produtos à base de ovos, assim como os peixes, quando consumidos crus ou preparados com tratamento térmico brando, podem transmitir *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, além de outros patógenos, resultando em infecções alimentares em humanos (BARANCELLI; MARTIN; PORTO, 2015; BRADEN, 2006).

Mundialmente, *Salmonella* é uma das principais causas de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), com incidência global anual estimada em 80,3 milhões de casos, gerando custos de aproximadamente 3,7 bilhões de dólares (GALIŞ *et al.*, 2013; HOWARD *et al.*, 2012; MAJOWICZ *et al.*, 2010; USDA-ERS, 2018). No Brasil, na última década, os serviços de alimentação, os quais incluem os restaurantes e padarias, foram os locais de maior ocorrência de surtos alimentares. *Salmonella* foi um dos principais microrganismos identificados como causador dos surtos e os ovos e produtos à base de ovos foram importantes

fontes desse microrganismo (BRASIL, 2022; TONDO; BARTZ, 2019) evidenciando a necessidade de controle.

Em relação aos peixes, uma das causas mais frequentes de doenças transmitidas por frutos do mar é *Listeria monocytogenes* (DILLON; PATEL, 1992; HITCHINS; WHITING, 2001; JOFRÉ *et al.*, 2016; KARIM; EMBAREK, 1994). A doença causada por esse patógeno denomina-se listeriose, a qual apresenta ocorrência relativamente baixa no mundo (2-15 casos por milhão de pessoas por ano), porém com alta taxa de letalidade para pessoas imunodeprimidas, idosos, grávidas e seus bebês, com taxa de mortalidade de até 30% dos casos (AUVOLAT; BESSE, 2016; SLEATOR *et al.*, 2009). No Brasil, embora *L. monocytogenes* tenha sido encontrada em diversos alimentos, dentre eles, em salmão *in natura* (48%) (CRUZ *et al.*, 2008), não há registros de surtos de listeriose por alimentos (BRASIL, 2022) o que não significa que eles não ocorram, mas que o mesmo agente etiológico não tem sido encontrado nas pessoas e nos alimentos envolvidos, devido, provavelmente, ao seu longo tempo de incubação (cerca de 2 meses).

No Brasil, conforme a legislação vigente, alimentos tratados termicamente devem atingir, no mínimo, 70°C, em todas as suas partes. Entretanto, temperaturas inferiores podem ser utilizadas, desde que assegurem a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos (BRASIL, 2004). Se considerados esses parâmetros, algumas preparações da gastronomia como *ceviche*, *tiramisù* e *eggnog* não atendem à legislação brasileira vigente, porém são preparadas em diferentes países, há muito tempo e, por vezes, identificadas como causadoras de surtos alimentares (CDC, 2008; CLARK, 2008; EFSA, 2008; HALL *et al.*, 2017; WHILEY; GARDNER; ROSS, 2017). Esses fatos levam ao questionamento de quais seriam os parâmetros suficientes, se existentes, de tempo e temperatura ou fatores intrínsecos das preparações, a fim de controlar perigos como *Salmonella* e *L. monocytogenes*, e esta resposta só pode ser dada com estudos como o aqui apresentado. Nesse estudo foram escolhidas três preparações, as quais apresentam critérios considerados não seguros em seu preparo, segundo a legislação brasileira. As preparações escolhidas compõem um menu de restaurantes, como uma preparação salgada, uma doce e uma bebida a fim de representar preparações consumidas em restaurantes. Foram

avaliados os modos de preparo das preparações selecionadas, na presença de *Salmonella* ou *L. monocytogenes* e além disso, medidas de controle foram sugeridas, conforme necessidade.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o comportamento de *Salmonella* e *L. monocytogenes* em *eggnog*, *tiramisù* e ceviche e propor alternativas viáveis que garantam a segurança microbiológica destas preparações.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Identificar modos de preparo de *eggnog*, *tiramisù* e ceviche;
- Analisar o comportamento de *Salmonella*, durante e após a preparação de *tiramisù* e da bebida *eggnog*;
- Avaliar o pH e/ou os padrões de tempo e temperatura durante e após as preparações e relacioná-los com o comportamento de *Salmonella* e *L. monocytogenes*;
- Analisar o comportamento de *L. monocytogenes*, durante e após a preparação de ceviche;
- Estudar a microbiota inicial e sobrevivente após o processamento da preparação ceviche;
- Se necessário, propor e testar alterações nas receitas, as quais garantam a segurança microbiológica das preparações;
- Examinar os principais perigos dos pescados e os principais cuidados necessários na aquisição, manipulação e preparação com segurança.

### 3. CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Restaurantes e Gastronomia

As transformações no comportamento de consumo favorecem o crescimento do mercado da alimentação fora de casa (SEBRAE, 2019). Aspectos como a progressiva urbanização, aumento da renda e as mudanças geradas nos hábitos de consumo aumentaram a demanda por esse tipo de alimentação (WHO, 2015). No Brasil, este setor tem grande participação no PIB com crescimento médio anual de 14,2%, sendo que, no ano de 2012, o setor de serviços de alimentação faturou R\$ 242,8 bilhões de reais, o que representou uma grande contribuição para o setor alimentício como um todo (SILVA *et al.*, 2019). O mesmo comportamento é observado em outros países, como na China e nos Estados Unidos da América (EUA), onde o crescimento nas despesas com o consumo de alimentos fora do lar apresenta um papel importante na economia (LIU *et al.*, 2015; USDA-ERS, 2019).

Nas últimas décadas, principalmente na gastronomia, aumentou a fusão da ciência e da culinária e, conseqüentemente, as colaborações entre cientistas e *chefs*. Essas colaborações geraram avanços nos estudos referentes à gastronomia e estimularam às inovações culinárias com a finalidade de proporcionar o prazer durante a alimentação, principalmente associado ao aspecto sensorial. Com isso, pesquisadores transformaram a cozinha em local de estudo, detalhando às transformações físico-químicas envolvidas na culinária e promovendo inovações tecnológicas (HUMPHRIES, 2012). Com a aplicação dos princípios científicos na culinária, torna-se possível explorar novas áreas na gastronomia, como por exemplo, o uso de técnicas que fornecem texturas inéditas (BARHAM *et al.*, 2010). Técnicas tais como, aquecimento com temperatura controlada em banho de água, cozimento a vácuo (*sous vide*), utilização de baixa temperatura por longos períodos, congelamento com uso de nitrogênio líquido, gelificação, formação de espumas e filmes comestíveis, são amplamente realizadas nas cozinhas da gastronomia (THATHSARANI; ALAHAKOON; LIYANAGE, 2022; ZHANG *et al.*, 2022) .

Muitas vezes em restaurantes, preparações que envolvem ovos e peixes são servidas sem tratamento térmico suficiente para inativar eventuais contaminações patogênicas, principalmente com o intuito de manter os ingredientes dos pratos macios, ou para modificar levemente a textura dos componentes, ou então para formação de espumas (VEGA; MERCADÉ-PRIETO, 2011). Em vista disso, há preocupações quanto à segurança dessas preparações, uma vez que essas matérias-primas podem estar contaminadas por microrganismos patogênicos.

### **3.2 *Salmonella enterica***

O gênero *Salmonella* está dividido em duas espécies (*S. enterica* e *S. bongori*) e pertence à família Enterobacteriaceae. São bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, não fermentadores de lactose e anaeróbios facultativos. *Salmonella* possui mais de 2600 sorovares, sendo os dois principais relacionados com infecções alimentares, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, ambos membros da espécie *S. enterica*. Com exceção dos sorovares *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, todos são móveis. O pH ótimo de multiplicação encontra-se próximo a neutralidade (6,6 – 8,2), e a  $A_w$  mínima em torno de 0,95. Multiplicam-se em temperaturas entre 5,3°C a 45°C, com temperatura ótima de 37°C (TONDO; BARTZ, 2019).

Os humanos e os animais, principalmente as aves, são reservatórios desses microrganismos em seu trato intestinal. Em geral, a infecção causada pelas bactérias da espécie *S. enterica* está comumente associada à ingestão de alimentos e água contaminados, principalmente os que possuem alto teor de umidade, proteína e carboidrato, como carne bovina, suína e de aves, ovos, leite e derivados, frutos do mar e sobremesas, e é denominada de salmonelose (CDC, 2014). Os sintomas relacionados a esta doença são para a maioria das pessoas saudáveis: diarreia, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça e às vezes febre que se manifestam entre 6 a 72 horas após a ingestão dos alimentos contaminados, sendo que persistem por 2 a 7 dias (HOFFMANN; MACULLOCH; BATZ, 2015). No entanto, infecções mais severas podem ocorrer em pessoas imunodeprimidas, onde a penetração da bactéria na corrente sanguínea pode



ocasionar até a morte (JAY, 2005). Apesar da dose infectante típica para humanos ser em torno de  $10^6$  a  $10^8$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g, há relatos de surtos com doses infectantes menores a 10 células de *Salmonella* por grama, pois a quantidade de células necessária para causar uma infecção humana depende da virulência de cada cepa, do grau de resistência do hospedeiro, da matriz alimentar e do estado fisiológico das células bacterianas (HUMPHREY, 2004).

Estima-se que *Salmonella* seja responsável por 80,3 milhões de casos, anualmente, de DTA, gerando um grande impacto econômico. Cerca de 4,14 bilhões de dólares são gastos com atendimentos, hospitalizações e mortes, podendo chegar a 10,69 bilhões de dólares em anos com maior incidência de casos (MAJOWICZ *et al.*, 2010; USDA-ERS, 2018). Nos EUA, em 2021, 14,2% dos casos identificados foram ocasionados por *Salmonella* (CDC, 2022). Na União Europeia (EU), a *Salmonella* foi a principal responsável nos surtos alimentares, totalizando 19,3%. *Salmonella* também foi associada ao maior número de casos (6.755 representando 20,8% do total de casos) e hospitalizações (1.123 representando 45% do total de surtos associados a hospitalizações) (EFSA, 2022). No Brasil, na última década, 11,2 % dos agentes etiológicos de surtos alimentares notificados foram identificados como *Salmonella*, sendo os serviços de alimentação os segundos locais de maior ocorrência dos surtos, contabilizando 15,1 % e os ovos e produtos a bases de ovos foram identificados entre os sete principais alimentos relacionados aos surtos, perfazendo 3,2 % (BRASIL, 2022).

### **3.3 *Listeria monocytogenes***

*Listeria* são pequenos bacilos gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e pertencente à família *Listeriaceae*. Multiplicam-se em temperaturas entre -0,4 e 45 °C com temperatura ótima de multiplicação entre 30 e 37 °C. O pH ótimo de multiplicação encontra-se próximo a neutralidade (6,0 – 9,0), porém o microrganismo consegue se multiplicar em ambientes com valores de pH entre 4,3 e 9,4; e  $A_w$  em torno de 0,92. O gênero *Listeria* é

atualmente composto por 26 espécies, sendo a *L. monocytogenes* a principal causadora de DTAs em humanos (CARLIN *et al.*, 2021; CASARIN *et al.*, 2016).

A listeriose, doença causada por este patógeno, apresenta uma ocorrência relativamente baixa (2-15 casos por milhão de pessoas por ano), principalmente em pessoas saudáveis, causando geralmente sintomas gastrintestinais leves. Porém, em pessoas imunodeprimidas ou idosos pode causar meningite ou septicemia, e pode afetar mulheres grávidas, causando aborto ou doença no recém-nascido. Nestes públicos, pode haver uma alta taxa de letalidade, cerca de 30% dos casos (AUVOLAT; BESSE, 2016; SLEATOR *et al.*, 2009). Dentre os alimentos mais comumente envolvidos nos surtos destacam-se aqueles prontos para o consumo, mantidos sob refrigeração e ingeridos sem aquecimento prévio, tais como leite e produtos lácteos, carne e derivados, vegetais e frutos do mar (ADZITEY; HUDA, 2010; FARBER; PETERKIN, 1991; RAMASWAMY *et al.*, 2007; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

Em 2021, na união europeia (EU), a taxa de notificação de listeriose humana apresentou um aumento em relação aos anos anteriores, com 2183 casos notificados (0,49 casos por 100.000 habitantes) (EFSA, 2022). Nos Estados Unidos da América (EUA), foram estimados 1.600 casos de listeriose, 1.500 hospitalizações e 260 mortes anuais (SCALLAN *et al.*, 2011). No Brasil, não foram registrados surtos de listeriose por alimentos (BRASIL, 2022). A falta de registros de surtos no Brasil pode estar relacionada à complexidade epidemiológica da doença, além do longo período de incubação (de 3 a 70 dias) da listeriose, sendo este um fator que dificulta a identificação do patógeno e a rastreabilidade do alimento contaminado (GANDHI; ZHOU, 2014).

As investigações sobre surtos e casos esporádicos de listeriose têm claramente indicado que o consumo de alimentos contaminados é uma das maneiras mais comum de transmissão de *L. monocytogenes*. Dentre os alimentos citados estão os prontos para consumo, mantidos sob refrigeração e ingeridos sem o adequado processamento térmico (70°C ou mais), como os pescados (ZHANG *et al.*, 2021)

### 3.4 Menu

Cardápio é definido como uma lista de preparações culinárias que compõem uma refeição ou lista de preparações que compõem todas as refeições de um dia ou período determinado (SILVA; BERNARDES, 2001). De acordo com a ocasião, os cardápios podem ser mais ou menos variados, refinados, simples ou modestos, mas devem obedecer a sequência predeterminada, que teve sua origem nos antigos romanos.

Alguns cardápios (*menus*) oferecem uma entrada, um prato principal, um prato de queijos ou uma sobremesa, além de uma bebida (COELHO, 2008). As preparações escolhidas para este projeto levam em consideração itens que representam um menu (entrada/prato principal salgado, sobremesa e bebida) e que levam em sua composição ingredientes que apresentam risco ou utilizam de técnicas insuficientes para garantir a segurança da preparação, tornando-as assim um risco para a saúde do consumidor.

#### 4.4.1 Ceviche

O ceviche é uma preparação que consiste em peixe cru misturado com legumes e marinado com suco de limão, o qual é popular nos países da América do Sul e semelhante aos produtos consumidos em muitas ilhas do Pacífico. As receitas de ceviche variam entre países e culturas. A maioria das receitas utiliza tilápia (*Oreochromis niloticus*) como frutos do mar. O suco de limão ou uma mistura de limão e outros sucos cítricos são utilizados para marinar o peixe cru. Outras variáveis importantes da receita incluem a temperatura (ambiente ou geladeira), corte do peixe (em cubos), o tempo de marinação (30-60 minutos) e os ingredientes utilizados (cebola, alho, sal e especiarias) (MATHUR; SCHAFFNER, 2013).

Devido à falta de tratamento térmico dessa preparação, outros parâmetros são utilizados como barreira contra microrganismos, como o pH ácido do suco de limão e a baixa temperatura de armazenamento. Embora diversos estudos demonstrem que essas medidas não são suficientes para eliminar completamente microrganismos patogênicos (FUCHS; SIRVAS, 1991; MATHUR; SCHAFFNER, 2013; TORRES-VITELA *et al.*, 2000) ainda não foram

encontrados estudos relacionando o uso de outros ingredientes, como a adição de bebidas alcoólicas ou, o uso de técnicas de processamento como *sous vide* em combinação com o armazenamento em embalagem à vácuo e que podem ser uma alternativa para garantir a segurança desta preparação.

#### **4.4.2 Tiramisù**

O *tiramisù* é uma sobremesa tipicamente italiana, possivelmente originária da cidade de Treviso, na região do Vêneto, e que consiste em camadas de biscoitos de *champagne* embebidas em café (confeiteiros/as profissionais geralmente dão preferência ao uso do café solúvel, tipo Nescafé, por ele permitir maior precisão no controle da receita) entremeadas por um creme à base de queijo mascarpone, creme de leite fresco, gema de ovo crua, açúcar, vinho do tipo Marsala (ou outra bebida alcoólica) e polvilhadas com cacau em pó e café (LE CORDON BLEU, 2019). Essa sobremesa não possui nenhum tratamento térmico, e após a sua preparação é mantida em refrigeração.

#### **4.4.3 Eggnog**

*Eggnog* ou gemada alcoólica é uma bebida alcoólica, de origem estadunidense servida na ceia de Natal, muito semelhante a gemada, mas adicionada de álcool. Tradicionalmente, o *eggnog* é uma combinação de leite, ovo e açúcar, servida com uma pitada de noz moscada e, com possibilidade de adição de bebidas alcoólicas como o conhaque ou rum (ABSOLUT DRINKS, 2020). A gema de ovo utilizada nessa bebida é crua e apesar de estar em contato com bebidas alcoólicas não há evidências científicas sobre a segurança desse drinque. Há um estudo sobre outra bebida alcoólica, a bebida peruana *pisco sour*, que envolve a presença de clara de ovo crua, onde foi comprovada a inativação de *Salmonella* (LOPES; TONDO, 2020).

### **3.5 Legislação**

Um dos principais fatores para evitar multiplicação e a sobrevivência de microrganismos em alimentos é o controle do tempo e da temperatura. Esse binômio deve ser adotado nos restaurantes, a fim de garantir a inocuidade dos alimentos prontos para o consumo e também prevenir surtos alimentares (WHO,

2006). Aspectos econômicos e de segurança de alimentos devem ser considerados em serviços de alimentação, incluindo restaurantes de alta gastronomia e também de hotéis, visto a expressividade deste segmento na economia do turismo (KO, 2013; WU, 2012). Nestas questões, uma efetiva aplicação de calor (tratamento térmico) auxilia e pode garantir a segurança de alimentos a serem consumidos, principalmente os altamente perecíveis, como as carnes, ovos e produtos prontos para o consumo.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) determina que os alimentos em geral, atinjam 70°C durante o cozimento (WHO, 2006). O *Codex Alimentarius* recomenda que o tempo e a temperatura dos alimentos cozidos oferecidos em serviços de alimentação, devem ser suficientes para garantir a destruição de microrganismos patógenos não produtores de esporos (CODEX ALIMENTARIUS, 2011). No Brasil, os alimentos devem ser submetidos ao tratamento térmico que garanta que todas as partes do alimento atinjam, no mínimo, 70°C. Entretanto, temperaturas inferiores podem ser utilizadas, desde que as combinações de tempo e temperatura sejam suficientes para assegurar a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos (BRASIL, 2004). No intuito de verificar se tais tratamentos alternativos são seguros, eles devem ser testados e validados, o que dificilmente é realizado em serviços de alimentação.

De um modo geral, os restaurantes preparam muitos alimentos perecíveis que necessitam de controle adequado de tempo e temperatura no recebimento, na manipulação e preparo, na exposição, no armazenamento e na distribuição, porém nem sempre o controle em todas as etapas é eficaz (CÔNSOLI, 2009; DA CUNHA; STEDEFELDT; DE ROSSO, 2014). Além disso, diversas preparações são consumidas de forma crua ou semi-cozidas. Embora muitas dessas preparações sejam realizadas em diferentes países, há muito tempo, e muitas vezes, não tenham sido relatadas como causadoras de surtos alimentares, estão em desacordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação e, até o presente momento, muitas delas não foram validadas a fim de identificar os parâmetros de tempo e temperatura adequados em seus preparos.

### 3.6 Análise Diagnostica de Microbiota via MALDI-TOF-TOF/MS

Entre as técnicas de identificação e presença de patógenos transmitidos por alimento, a Espectrometria de Massa Associada à Dessorção/Ionização de Matriz Assistida por Laser e Tempo de vôo (MALDI-TOF/MS) foi considerada como uma excelente ferramenta para detecção e discriminação de vários tipos de micro-organismos como bactérias e fungos (ELBEHIRY *et al.*, 2017). O MALDI/TOF-MS consiste em um sistema no qual o material biológico (amostra da colônia pura ou a amostra previamente tratada) é introduzido em uma placa metálica com 384 poços (*spots*) com posterior adição de uma matriz polimérica. O produto da reação entre amostra-matriz (analito) é bombardeado com um laser que vaporiza a amostra e promove sua ionização. Tudo ocorre em um tubo de vácuo que aspira estes analitos até um detector. De acordo com este composto, o tempo de chegada ao detector (*time of flight*) é diferente, gerando picos diferentes para cada amostra. A identificação dos microrganismos ocorre através da geração de picos oriundos das proteínas abundantes, seguido de correlação com os espectros de referência em um banco de dados (PASTERNAK, 2012).

A leitura e interpretação dos picos encontrados ocorrem com muita rapidez, sendo apresentados em conjunto com o “score”, que permite avaliar o quanto similar foi o espectro gerado em relação ao banco de dados. Os resultados acima de 2300 são indicativos de elevada probabilidade de identificação em nível de espécie, sendo que resultados entre 2000 – 2299 significam identificação segura do gênero e provável da espécie (verde) e aqueles entre 1700 e 1999 significa que houve uma provável identificação do gênero (amarelo). Resultados abaixo destes scores não apresentam identificação confiável (vermelho).

A utilização da ferramenta MALDI/TOF-MS auxilia na avaliação da microbiota dos alimentos e, desta forma, orienta para qual conduta seguir frente aos microrganismos presentes nas matérias-primas utilizadas para as preparações. Com isso, pode-se propor alternativas viáveis durante o preparo das receitas, objetivando reduzir e ou inativar os microrganismos ali presentes, a fim de tornar as preparações seguras para o consumo.

### 3.7 Capítulos

Os materiais e métodos, resultados e discussão desta tese serão apresentados a seguir na forma de capítulos. O capítulo 2 descreve em forma de artigo a influência de tratamentos térmicos na sobrevivência de *Salmonella* na bebida *eggnog*. O capítulo 3 descreve em forma de artigo o comportamento de *Salmonella* na sobremesa *tiramisù*. O capítulo 4 descreve em forma de artigo o estudo da Avaliação de *Listeria monocytogenes* na preparação ceviche. O capítulo 5 descreve em forma de capítulo de livro o estado atual do conhecimento da utilização e segurança de pescados e preparações envolvendo pescados na gastronomia. Ao final dos artigos há uma discussão geral sobre os trabalhos realizados nesta tese de doutorado.

## 4. CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1

Influence of heat treatments on *Salmonella* survival in eggnog drink

Danielle Carmo da Silva, Stefani Machado Lopes, Eduardo César Tondo

Artigo publicado na revista International Journal of Gastronomy and Food Science

International Journal of Gastronomy and Food Science 33 (2023) 100792



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

International Journal of Gastronomy and Food Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijgfs](http://www.elsevier.com/locate/ijgfs)



Influence of heat treatments on *Salmonella* survival in eggnog drink



Danielle Carmo da Silva<sup>a,\*</sup>, Stefani Machado Lopes<sup>a</sup>, Eduardo Cesar Tondo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Microbiology and Food Control, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande Do Sul (ICTA/UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Building 43212, Campus Do Vale, Agronomia, CEP. 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brazil



## **Influence of heat treatments on *Salmonella* survival in eggnog drink**

### **Abstract**

Eggnog is a well-known creamy drink prepared with sugar, milk, spices, egg yolks, and in some cases added alcoholic beverages. However, concerns were raised about its safety because egg yolk can be contaminated by *Salmonella*. In this study inoculated egg yolks (8.5 log CFU/ml) were used to prepare eggnog forming a drink with 0.4%ABV., pH 6.31, 7.40 log CFU/ml of *Salmonella* and tested in three different scenarios: A= without any heat treatment; B= mild heat treatment (until 70°C); C= high heat treatments (until 80 and 70°C). Samples were collected at seven times after rum was added at 5°C, and 24 h at 25°C. Microbiological results demonstrated that in scenario A, the counts did not show a significant reduction. In scenario B, *Salmonella* counts were reduced by approximately 2.6 log CFU/ml after the heat treatment. Eggnog prepared according to scenario C demonstrated *Salmonella* reductions of more than 5 log CFU/ml. After storage at 25°C for 24h, *Salmonella* counts reached 8.39, 8.40 and 4.34 log CFU/ml in scenarios A, B and C, respectively. Based on the results, we suggest the safe way to consume the eggnog drink is to purchase eggs that came from industries inspected and supervised by regulatory agencies, to prepare it with high heat treatment and to consume it immediately.

**Keywords:** Gastronomy, Alcohol, Pasteurization, Pathogen.

### **1 Introduction**

Eggnog is a creamy, chilled, sweetened, dairy-based beverage. It is traditionally made with milk, cream, sugar, and egg yolks (which gives it a frothy texture, and its name). While the exact origin of this holiday drink is a bit ambiguous, most historians agree that eggnog began as a hot, non-alcoholic mixture in England at some point during the 17th century. However, the British colonists in North America decided to increment the beverage and began adding alcoholic beverages in the eggnog (Gorbenko, 2021). Distilled spirits such as

brandy, whiskey and rum are often a key ingredient, the last being the most used. Throughout Canada and the United States, eggnog is traditionally consumed over the Christmas season. During that time, commercially prepared eggnog is sold in grocery stores in these countries. Eggnog is also homemade using milk, eggs, sugar, flavorings and served with cinnamon or nutmeg. While eggnog is often served chilled, in some cases it is warmed, particularly on cold days (Graham, 2021). In the 19th century rolled around, eggnog had become such a popular drink that it became a holiday staple all over the newly formed nation. With eggs being both cheap and plentiful, eggnog naturally became the beverage of choice to serve at large holiday gatherings. And while premade, non-alcoholic eggnog is certainly an option, the consumers like to focus on the classic, spirited version (Gorbenko, 2021).

However, eggs are frequently associated with salmonellosis (BRASIL, 2022; EFSA, 2017; Kim and Kim, 2021) and although the low prevalence (EFSA, 2017), egg preparations commonly raise concerns about the food safety of the servings. For example, eggnog was identified as the cause of disease outbreak illness in Australia when three children reportedly became ill after drinking eggnog (Poultry World, 2007). Generally, contaminated eggs present a low number of *Salmonella* (<20/egg) (Humphrey et al., 1991). Nevertheless, the physicochemical characteristics (pH, aW, minerals, vitamins) of yolks can lead contribute to the growth of this pathogen when eggs are stored at environmental temperatures (25°C) (Gumudavelli et al., 2007). This contamination might have contributed to a severe impact linked to *Salmonella* on foodborne illnesses, once the number of salmonellosis in human cases related to the eggs is high - since *Salmonella* is one of the main causes of foodborne diseases worldwide (Cardoso et al., 2021), especially due to the insufficient heat treatment of egg preparations (EFSA, 2022).

The heat treatment process is the most common method to inactivate *Salmonella* in egg yolk and egg yolk preparations. In order to ensure the safety of these preparations, regulatory agencies require the thermal processing of egg yolks until it reaches at least a temperature of 70°C (BRASIL, 2004; CDC, 2011). However, different studies showed that the incorporation of sugar in egg yolk tends to increase the heat resistance of *Salmonella* (Doyle and Mazzotta, 2000;

Palumbo et al., 1995a) even when high heat treatment was used (Lopes et al., 2020). In addition, bacterial cells are more difficult to inactivate in high-fat foods, like egg yolk preparations (Jin et al., 2019; Verma et al., 2018). On the other hand, the alcohol could play an important role against *Salmonella* survival. Studies demonstrated that this pathogen could be inactivated in contact with alcoholic beverages such as whisky, martini, tequila, scotch and pisco (Gaglio et al., 2017; Lopes and Tondo, 2020a; Marimón, 1998). Thus, this study aimed to evaluate the effect of different heat treatments on *Salmonella* survival in eggnog drinks, and the effect of the alcoholic beverage addition against this pathogen.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 *Salmonella* serotypes and inoculum preparation**

Five *Salmonella* serotypes were used to compose a pool: *S. Typhimurium* L12031, *S. Enteritidis* SE86 (isolated from foods involved in foodborne disease outbreaks), *S. Minnesota*, *S. Enteritidis* 55507, and *S. Heidelberg* (isolated from poultry). All the serotypes were isolated in the State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil and are part of the bacterial culture collection from the Laboratory of Food Microbiology and Food Control (ICTA/UFRGS). The serotypes were grown individually in 5 ml of Brain Heart Infusion broth (BHI; Merck, Darmstadt, Germany) at 37°C, for 18–24 h. After incubation, 2 ml of BHI broth containing each serotype were used in order to form 10 ml of *Salmonella* pool. The pool was centrifuged (1000g, 10 min, 4°C) (CIENEC CT-5000 R, Brazil), the supernatant was discarded, and the pellet was washed three times with 0.1% peptone water (w/w) (Merck, Darmstadt, Germany). Finally, cells were resuspended in 0.1% peptone water (w/w) and the final cell concentration was 10<sup>8</sup> CFU/ml, adjusted by optical density (OD<sub>630nm</sub>) using Ultrospec 3100™ pro (Amersham Biosciences, United Kingdom) and confirmed by plating on XLD agar (Merck, Darmstadt, Germany). The inoculum was used in eggs as described below.

### **2.2 Growth of *Salmonella* pool inoculation in eggs**

Eggs (Naturvos, Salvador do Sul, Brazil), weighing 60–68 g were chosen and the yolk was inoculated according to the method reported by (Lopes et al., 2018) with few modifications. A sterile needle (Descarpack, Jiangsu Jichun

Medical Devices Co., China) attached to a syringe (Plastipak TM Becton Dickinson) was used to inoculate 100 CFU of the *Salmonella* pool in yolks (weighing 18–22 g). A hole was punched through the shell of each egg and the needle was inserted about 2.5 cm until reached the yolk. After inoculation, a Scotch tape (Scotch, 3 M, Brazil) was used to close the hole in the shell, and eggs were incubated at 37°C for 24 h. After incubation, the *Salmonella* population was counted and ranged from 7 to 8.5 log CFU/g.

### **2.3 Egnog preparation**

After 18–24 h of incubation, artificially contaminated eggs were stored for 60 min at room temperature, and then the yolks were aseptically separated from the egg whites by gloved hands. Contaminated egg yolks were used to make the eggnog drink. Among a variety of eggnog recipes in the literature and found on the internet, the drink was prepared in three different ways, from a compilation of these findings that presented methods capable of microbial reduction, which were called scenarios A, B and C.

#### **2.3.1 Scenario A**

Three yolks were placed into a sterilized glass beaker and 100 g of sugar was incorporated. This blend was mixed at room temperature with a previously sterilized fork for approximately 5 minutes until it doubles in volume and reaches a creamy thickness. Then, in a disinfected glass beaker, 480 ml of milk, 120 ml of milk cream, 1.9 g of cinnamon powder, 1.6 g of salt and 0.5 g of nutmeg were mixed and added to the mixture of egg-sugar. Finally, 30 ml of Rum (Montila, Pernod Ricard Brasil Industria e Comercio LTDA, Cabo de Santo Agostinho, PE) with an alcohol content of 36% ABV and pH 5.24 was added. This scenario was carried out in order to evaluate only the effect of alcohol on *Salmonella* survival, without heat treatment.

#### **2.3.2 Scenario B**

Three yolks were placed into a sterilized glass beaker and 100 g of sugar was incorporated. This blend was mixed at room temperature with a previously sterilized fork for approximately 5 minutes until it doubles in volume and reaches

a creamy thickness. Then, a mixture of 480 ml of milk, 120 ml of milk cream, 1.9 g of cinnamon powder, 1.6 g of salt and 0.5 g of nutmeg was heated until reaches 70°C. After, the blend of egg-sugar was tempered with the mixture at 70°C (slowly diluting the blend with the hot milk, always mixing) and then 30 ml of Rum was incorporated. This scenario was carried out to evaluate the effect of mild heat treatment on *Salmonella* survival and the effect of Rum addition against this pathogen.

### **2.3.3 Scenario C**

Three yolks were placed into a sterilized glass beaker and 100 g of sugar was incorporated. This blend was mixed at room temperature with a previously sterilized fork for approximately 5 minutes until it doubles in volume and reaches a creamy thickness. Then, a mixture of 480 ml of milk, 120 ml of milk cream, 1.9 g of cinnamon powder, 1.6 g of salt and 0.5 g of nutmeg was heated until reaches 80°C. After, the blend egg-sugar was tempered with the mixture at 80 °C (slowly diluting the blend with the hot milk, always mixing). After the temper, the whole mixture was placed into a water bath until reached 70 °C and then, 30 ml of Rum was incorporated. This scenario was carried out to evaluate the effect of two heat treatments (high heat treatment) on the *Salmonella* survival and the effect of Rum addition against this pathogen.

## **2.4 Microbiological analysis**

Immediately after the drink preparation, the eggnog drink was stored at 5°C and aliquots at each set time point (0 (scenario A), before and immediately after the tempering with milk (scenario B and C), after the re-heat treatment (scenario C), 10, 15, 25, 60, 120 min and 24 hours after rum was added in all scenarios, were collected and *Salmonella* quantification was carried out. In order to evaluate the behavior of *Salmonella* in the eggnog drink in different consumption scenarios, i.e., at room temperature in the next day, samples of the three scenarios (A, B and C) were stored at 25°C and aliquots were taken and analyzed after 24h. Before each sampling, the drink was slowly homogenized for 5 s using an electric stirrer (Edutec EEQ9008A-2, Curitiba, Brazil). Decimal dilutions were obtained by mixing aliquots of 1 ml of contaminated eggnog drink

with 9 ml of 0.1% peptone water (w/w), and 100 µl of each dilution were spread on Xylose Lysine Desoxycholate agar (XLD, Merck, Darmstadt, Germany). Egnog samples when subjected to heat treatment were plated on XLD plates plus a thin layer of Tryptic Soy Agar (TSA, KASVI, Italy), according to the one-step TAL method report by Kang & Fung (2000). This method was used to recover possible injured *Salmonella*. Bacterial counts were carried out after the incubation for 24h at 37°C and expressed as log CFU/ml. The detection limit was 100 CFU/ml. When increased sensitivity was required, 1000 µL of the first dilution was plated on three XLD-TSA agar plates (300, 300 and 400 µL by plate).

## **2.5 Temperature profile, pH e water activity**

Egnog samples (not inoculated) were used to monitor the temperature profile of the scenarios B and C. K-type thermocouples were placed inside the beaker where the drink was prepared, and the temperature was monitored using a data logger (Tenmars, Taiwan).

The pH was measured using a pH meter model Q400A (Quimis®, São Paulo, Brazil), while the water activity (a<sub>w</sub>) was measured by a Water Activity Analyser (Decagon Devices, Washington, US), resulting in 6.31 and 0.992, respectively.

The analysis was performed in triplicate.

## **2.6 Data analysis**

The *Salmonella* counts on three scenarios of egnog were analyzed for significant differences ( $p \leq 0.05$ ), using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test using SAS Studio® online software.

## **3 Results and discussion**

### **3.1 Temperature profile during heat treatment processes**

The temperature profiles of scenario B and scenario C of the egnog drink during its preparations and its storage for 24h at 5°C are presented in Figure 1. In general, the heating profile in the mild heat treatment using in the scenario B and

the high heat treatments using in the scenario C were similar. However, in scenario C, it is possible to notice two peaks. The first refers to the tempering process with the milk at 80 °C, and the second when the drink is subjected to a water bath. As expected, the use of milk at 80 °C in the tempering stage in Scenario C promoted greater heating in a shorter time when compared to tempering using milk at 70 °C. When mild heat treatment was used (B scenario) the eggnog drink took approximately 50 minutes to reach refrigeration temperature (5°C). On the other hand, when high heat treatment (C scenario) was used, the drink took approximately 300 minutes to reach the same temperature, probably due to the two consecutive heat treatments applied (80 and 70°C), compared to scenario B.

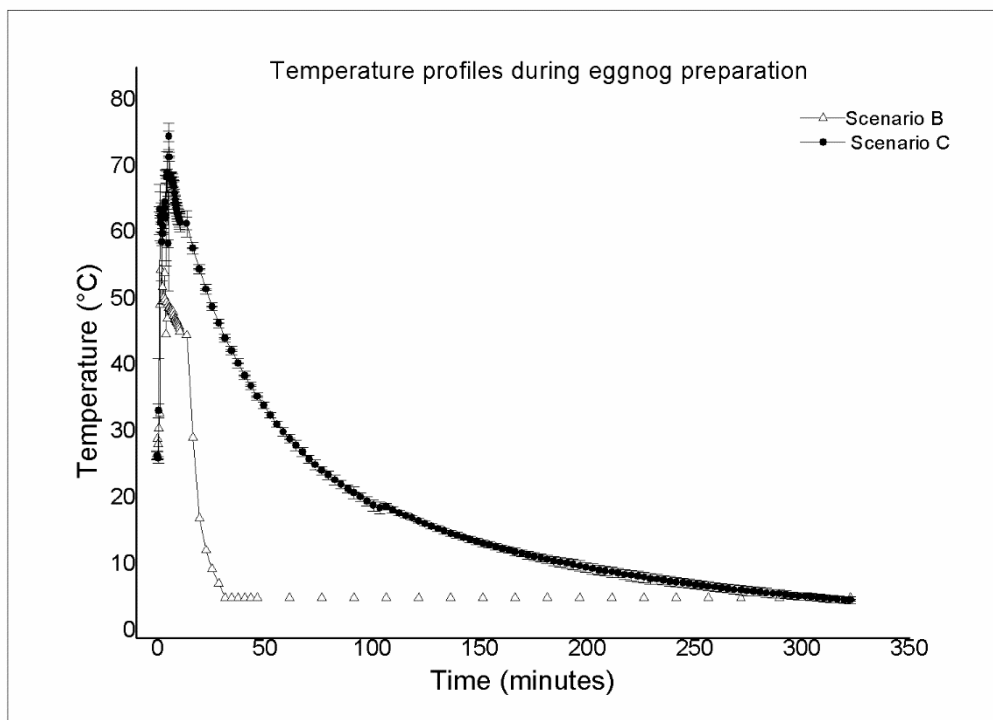


Figure 1 – Temperature profiles during eggnog preparation

### 3.2 *Salmonella* survival and temperature control in the eggnog drink

The initial mean concentration of *Salmonella* in the eggnog drink at time 0 was approximately  $7.40 \pm 0.1$  log CFU/ml. The microbiological results indicated that no eggnog drink scenario was able to completely inactivate *Salmonella*. In

the scenario A (Figure 2), without any heat treatment applied, although the counts were reduced around 1 log CFU/ml with the tempering with milk at room temperature ( $8.38 \text{ a} \pm 0.22 - 7.40 \text{ a} \pm 0.55 \text{ log CFU/ml}$ ), this reduction had no significant differences ( $p \geq 0.05$ ). After 10, 15, 25, 60, 120min and 24h of refrigerated storage at  $5^\circ\text{C}$ , the counts remained constant with  $7.43 \text{ a} \pm 0.70$ ,  $7.55 \text{ a} \pm 0.68$ ,  $7.49 \text{ a} \pm 0.57$ ,  $7.28 \text{ a} \pm 0.69$ ,  $7.35 \text{ a} \pm 0.57$  and  $7.33 \text{ a} \pm 0.56 \text{ log CFU/ml}$  respectively, with no significant differences ( $p \geq 0.05$ ) from each other and the initial contamination. The 1 log reduction presented in the drink when compared to the initial contamination of raw yolks ( $8.5 \text{ log CFU/ml}$ ) is likely due to the dilution of *Salmonella* present in eggs yolks when mixed with other ingredients. The addition of the alcoholic beverage (rum) showed no significant reduction ( $p \geq 0.05$ ) in *Salmonella* counts during 24h under refrigerated storage. However, when storing this drink at room temperature ( $25^\circ\text{C}$ ) for 24 h, the bacterial cells return to their initial count of  $8.39 \text{ a} \pm 0.19 \text{ log CFU/ml}$ . This effect probably happens because eggnog have nutrients and sufficient water content which allowed the recovery of *Salmonella* injured cells. Beyond that, the temperature elevated physiological activity of cells, contributing to their fast recovery, since  $25^\circ\text{C}$  is within the optimal temperature range for the growth of mesophiles microorganisms ( $20 - 45^\circ\text{C}$ ), such as *Salmonella*.

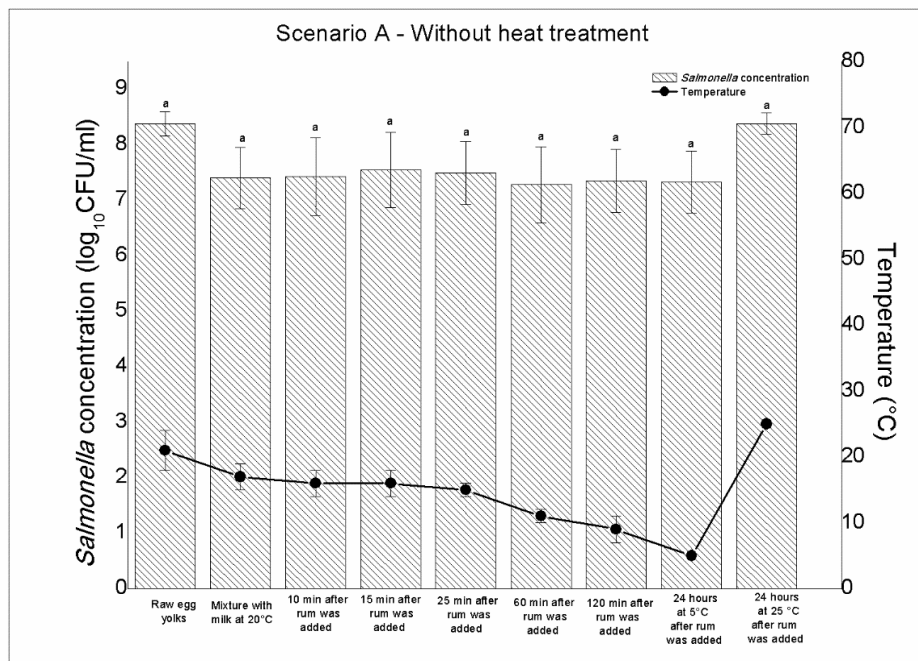


Figure 2 – Eggnog Scenario A – *Salmonella* Survival without any heat treatment



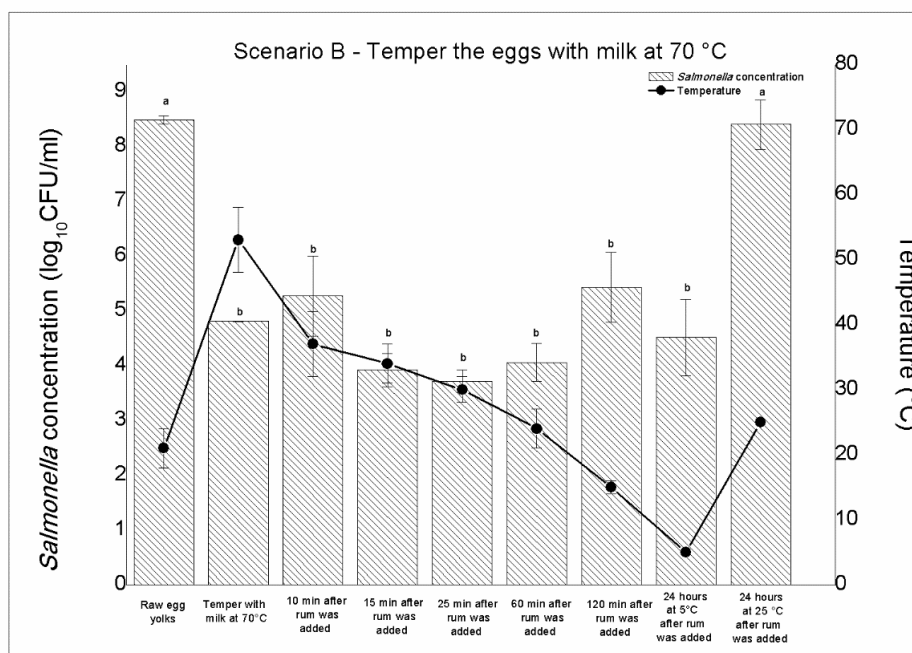
Several studies demonstrate the effectiveness of alcoholic beverages against pathogenic microorganisms. (Gaglio et al., 2017) inoculated three different enteric bacteria in ice cubes (60 ml) and added them in 100 ml of whisky (40% ABV., pH 4.2) and in Martini (14.4% ABV, pH 3.8). After 1h of exposure, bacterial counts decreased consistently in both drinks, and in Martini all the cells were inactivated (2.6 log CFU/100 ml reduction). In other study, ice cubes (20 ml) inoculated with *S. Typhimurium* (3 log CFU/100 ml) in contact with 100 ml of tequila (43% ABV) and scotch (40% ABV) showed 5% and 11% of remaining viable bacteria after 1 h of exposure, respectively (Marimón et al. 1998). Greater reductions (6.1 log CFU/ml) were found by Lopes & Tondo (2020) who analyzed the survival of *Salmonella* in Peruvian pisco sour drink (alcoholic cocktail prepared with egg white, pisco 42% ABV and pH 3.9, lemon juice, syrup, ice, angostura and egg white) and concluded that the alcohol content (18% ABV) associated with a low pH (3.0) was the main factor responsible for the *Salmonella* reduction in this drink.

The differences among microbial reductions obtained in our study and those demonstrated in other studies are probably due to different types of beverages studied, presenting different alcohol contents and pH. For example, in our study, rum was added in eggnog (rum - 36% ABV, pH 6.31), reaching a final alcohol content of 0.4% which is much lower than those presented in the studies. Based on our results, the low alcohol content in eggnog was not sufficient to significantly reduce *Salmonella* counts. Considering that *Salmonella* can eventually contaminate eggnogs and, in general, the amount of alcohol in eggnog recipes and their pH are not sufficient to keep the drink free of *Salmonella* contamination, it is recommended that a heat treatment be applied before the drink consumption.

In scenario B, the *Salmonella* survival was studied after a heat treatment due to tempering contaminated yolks with milk at 70°C. Results demonstrated that *Salmonella* counts significantly decreased ( $p \leq 0.05$ ) 2.59 log CFU/ml, going from  $7.40a \pm 0.08$  to  $4.81b \pm 0.00$  log CFU/ml. The temperature of the whole drink reached  $53 \pm 5^\circ\text{C}$ , even though the milk was  $70^\circ\text{C}$  (Figure 3). After 10, 15, 25, 60, 120 min and 24 hours at  $5^\circ\text{C}$  after the rum addition, there was no significant reduction in counts ( $p \geq 0.05$ ), and the *Salmonella* population in eggnog remained

with  $5.27b \pm 0.73$ ,  $3.92b \pm 0.30$ ,  $3.72b \pm 0.20$ ,  $4.06b \pm 0.34$ ,  $5.43b \pm 0.64$  and  $4.51b \pm 0.70$  log CFU/ml, respectively. The reductions found in our study are in agreement with other studies that also used mild heat treatment to inactivate *Salmonella*. (Lopes and Tondo, 2020b), studied the Survival of *Salmonella* in spaghetti alla carbonara and demonstrated that after cooked and drained, the pasta reached a temperature of  $86.0 \pm 1.7^\circ\text{C}$ ; however, after 4.5 min of contact with the contamination egg yolks, the mean temperature of spaghetti alla carbonara decreased to lower than  $60^\circ\text{C}$ , being able to inactivate 4.70 log CFU/g of *Salmonella* (initial concentration 8.70 log CFU/g). In other study, (Lopes et al., 2020), evaluated the effect of mild heat treatments on the *Salmonella* survival of cured chicken egg yolk and showed that yolk cured for 2h and treated at  $62^\circ\text{C}$  for 30 min presented 5.6 log CFU/g of *Salmonella* reduction (initial concentration 8.4 log CFU/g).

As noted in scenario A, in scenario B the rum had no effect against *Salmonella*, neither reducing nor preventing multiplication. *Salmonella* was able to recover and reach similar counts obtained before the heat treatment ( $8.40 a \pm 0.45$  log CFU/ml) when the drink was stored at  $25^\circ\text{C}$  for 24h.



Figure

Figure 3 - Eggnog Scenario B – *Salmonella* Survival tempering the eggs with milk at  $70^\circ\text{C}$

In scenario C high heat treatments were applied during eggnog preparation, i.e. tempering with milk at 80°C plus reheating the whole drink to 70°C. Results demonstrated that higher *Salmonella* inactivation was obtained in scenario C, when compared to scenario A and B (Figure 4). In the first stage of the recipe (tempering with milk at 80°C) the mixture reached the temperature of 61.5±5°C in few seconds and the counts of *Salmonella* reduced from 7.40a±0.20 to 2.00bc±0.05, (5.40 log CFU/ml reduction). After that, in the second heat treatment, the drink was placed in a bath water until reaching 70°C. In this temperature, the counts of *Salmonella* were not detected (<10 CFU/ml). However, in the samples collected after rum addition until 24h in refrigerated storage (5°C), the counts of *Salmonella* ranged from undetected to approximately 2 log CFU/ml. This result demonstrates that the bacterial cells were probably not detectable in some points due to the stressed caused by the high heat treatments that they were subjected, which prevented its recovery on the plate. When the same beverage was stored at room temperature (25°C) after the high heat treatments and the addition of the alcoholic beverage, the counts reached 4.34bc±1.45 log CFU/ml, confirming that the inactivation of *Salmonella* in the eggnog drink was not complete even though it was subjected to high temperatures. Similar to these results, a study carried out by Lopes et al, (2020) evaluated the effect of high heat treatment in the *Salmonella* counts of cured chicken egg yolk and demonstrated that although cured yolks processed by electric oven reaches high temperatures (80°C), which is considered sufficient to kill *Salmonella* (>70°C) (BRASIL, 2004; CDC, 2011), it was not enough to promote the complete inactivation of *Salmonella* population. Some factors can be responsible for these remaining counts, different studies showed that the incorporation of sugar in egg yolk tends to increase the heat resistance of *Salmonella* (Doyle and Mazzotta, 2000; Palumbo et al., 1995b) even when high heat treatment was used (Lopes et al., 2020). In addition, bacterial cells are more difficult to inactivate in high-fat foods, like egg yolks preparations (Jin et al., 2019; Verma et al., 2018). This result highlights the importance of storing ready-to-eat (RTE) products under refrigeration if they are not consumed immediately, as in the case of the eggnog drink.

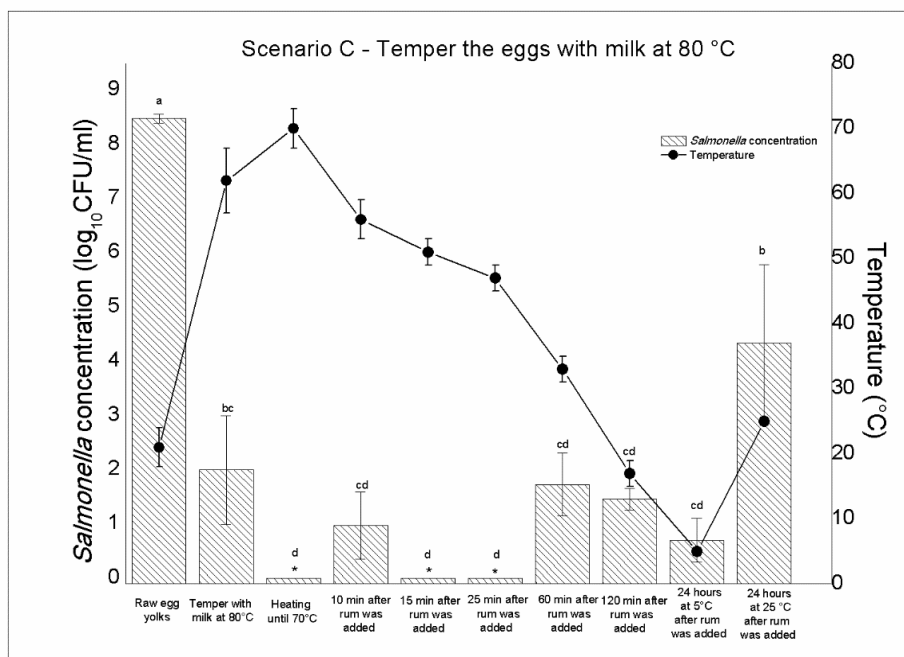


Figure 4 - Egnog Scenario C - *Salmonella* Survival tempering the eggs with milk at 70 and 80°C.

#### 4 Conclusion

The results of the present study demonstrated that when the eggnog drink was prepared without any heat treatment (scenario A), *Salmonella* counts were not significantly reduced ( $p \geq 0.05$ ). On the other hand, when the mild heat treatment (scenario B) and the other with high heat treatments (scenario C) were used with the drink stored at refrigerated temperature (5°C), *Salmonella* counts were significantly reduced ( $p \geq 0.05$ ) by approximately 2.60 log CFU/ml and 5.40 log CFU/ml, respectively. Although, when drinks were stored at room temperature (25°C) for 24 h in the scenarios A, B and C, the counts of *Salmonella* reached, 8.39, 8.40 and 4.34 log CFU/ml, respectively.

Our findings demonstrated that the amounts of the alcoholic beverage used in the eggnog preparation was not effective against *Salmonella*. In addition, even when heat treatments were applied, *Salmonella* cells were recovered, probably due the amounts of sugar and fat present in this drink, which tends to increase the heat resistance. Moreover, the storage at room temperature for later consumption is not recommended, due to the ability of the remaining cells to

multiply and reach high counts. Based on these results, if this drink is prepared with highly *Salmonella* contaminated egg yolk it may not be safe to the consumer. Thus, to improve the safety of this drink, it is advisable the use of pasteurized or thermo-processed egg yolk. Unprocessed eggs, which came from good quality industries and are maintained in cold chain, present low numbers of *Salmonella*, i.e., 1 to 3 log CFU/g, and can be sufficient to completely eliminate *Salmonella* and promote the safety of the eggnog drink when high heat treatment was used. In summary, it is advisable to purchase eggs come from good quality industries, prepare the drink with an efficient heat treatment, and consume immediately. Otherwise, its storage must be kept refrigerated until consumption.

### **Acknowledgments**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Finance Code 001.

### **5 References**

BRASIL, 2022. Surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2022.

BRASIL, 2004. Resolução RDC no 216, de 15 de Setembro de 2004. Agência Nacional da Vigilância Sanitária, Brasil.

Cardoso, M.J., Nicolau, A.I., Borda, D., Nielsen, L., Maia, R.L., Møretrø, T., Ferreira, V., Knøchel, S., Langsrud, S., Teixeira, P., 2021. *Salmonella* in eggs: From shopping to consumption—A review providing an evidence-based analysis of risk factors. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 20, 2716–2741. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12753>

CDC, 2011. How Restaurants Prepare Eggs EHS-Net Study Findings and Recommendations What the Study Described.

Doyle, M.E., Mazzotta, A.S., 2000. Review of Studies on the Thermal Resistance of *Salmonella* e. J Food Prot 63, 779–795. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.6.779>

EFSA, 2022. *Salmonella* story map.

EFSA, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA Journal 15. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2017.5077>

Gaglio, R., Francesca, N., di Gerlando, R., Mahony, J., de Martino, S., Stucchi, C., Moschetti, G., Settanni, L., 2017. Enteric bacteria of food ice and their survival in alcoholic beverages and soft drinks. Food Microbiol 67, 17–22. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2017.04.020>

Gorbenko, M., 2021. What is eggnog? [WWW Document]. <https://www.abcfws.com/all-about-eggnog>.

Graham, C., 2021. History and Origins of Eggnog [WWW Document]. The Spruce Eats. URL <https://www.thespruceeats.com/origins-of-eggnog-760173> (accessed 12.25.21).

Gumudavelli, V., Subbiah, J., Thippareddi, H., Velugoti, P.R., Froning, G., 2007. Dynamic predictive model for growth of *Salmonella* enteritidis in egg yolk. J Food Sci 72. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00444.x>

Humphrey, T.J., Whitehead, A., Gawler, A.H.L., Henley, A., Rowe, B., 1991. Numbers of *Salmonella* enteritidis in the contents of naturally contaminated hens' eggs. Epidemiol Infect 106, 489–496. <https://doi.org/10.1017/S0950268800067546>

Jin, Y., Tang, J., Sablani, S.S., 2019. Food component influence on water activity of low-moisture powders at elevated temperatures in connection with pathogen control. LWT 112, 108257. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108257>

Kang, D.-H., Fung, Daniel.Y.C., 2000. Application of thin agar layer method for recovery of injured *Salmonella* typhimurium. *Int J Food Microbiol* 54, 127–132. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00174-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00174-9)

Kim, S.O., Kim, S.S., 2021. Recent (2011–2017) foodborne outbreak cases in the Republic of Korea compared to the United States: a review. *Food Science and Biotechnology* 2021 30:2 30, 185–194. <https://doi.org/10.1007/S10068-020-00864-X>

Lopes, S.M., Fösch Batista, A.C., Tondo, E.C., 2018. *Salmonella* survival during soft-cooked eggs processing by temperature-controlled water circulator. *Food Control* 94, 249–253. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.028>

Lopes, S.M., Silva, D.C. da, Tondo, E.C., 2020. Effect of curing and heat treatments on the *Salmonella* survival and physicochemical properties of chicken egg yolk. *Food Research International* 137, 109680. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109680>

Lopes, S.M., Tondo, E.C., 2020a. Survival of *Salmonella* in Peruvian pisco sour drink. *LWT* 117, 108608. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108608>

Lopes, S.M., Tondo, E.C., 2020b. Survival of *Salmonella* in spaghetti alla carbonara. *LWT* 123, 109115. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109115>

Marimón, J.M., Bujanda, L., Gutierrez-Stampa, M.A., Cosme, A., Arenas, J.I., 1998. Antibacterial Activity of Wine Against *Salmonella* enteritidis: *Journal of Clinical Gastroenterology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/00004836-199809000-00021>

Palumbo, M.S., Beers, S.M., Saumya, B.A., Palumbo, S.A., 1995a. Thermal Resistance of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in Liquid Egg Yolk and Egg Yolk Products. *J Food Prot* 58, 960–966. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.9.960>

Palumbo, M.S., Beers, S.M., Saumya, B.A., Palumbo, S.A., 1995b. Thermal Resistance of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in Liquid Egg Yolk

and Egg Yolk Products †. J Food Prot 58, 960–966. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.9.960>

Poultry World, 2007. Australia: *Salmonella* outbreak caused by raw eggs - Poultry World [WWW Document]. URL <https://www.poultryworld.net/poultry/australia-salmonella-outbreak-caused-by-raw-eggs/> (accessed 6.4.22).

Verma, T., Wei, X., Kiatlau, S., Bianchini, A., Eskridge, K.M., Stratton, J., Anderson, N.M., Thippareddi, H., Subbiah, J., 2018. Response Surface Methodology for *Salmonella* Inactivation during Extrusion Processing of Oat Flour. J Food Prot 81, 815–826. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-347>



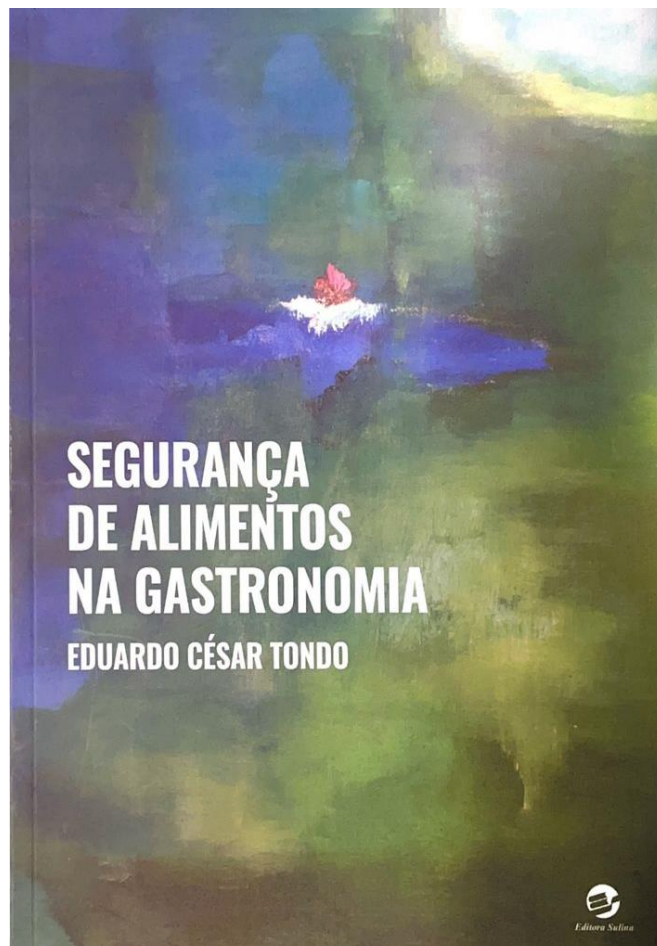
## 7. CAPÍTULO 5 – CAPÍTULO DE LIVRO

Pescados

Danielle Carmo da Silva

Capítulo está inserido no livro Segurança de Alimentos na Gastronomia publicado em 2022

O capítulo está formatado de acordo com as especificações do livro



## **Pescados**

### **Introdução**

Os peixes e frutos do mar são consumidos desde a pré-história e desempenham um papel importante na alimentação humana, devido ao fato de serem importantes fontes de proteínas, vitaminas do complexo B e diversos minerais. Muitos peixes possuem quantidades menores de gorduras e, por isso, oferecem esses nutrientes sem excesso de calorias, chamando a atenção do público que visa a alimentação saudável, com sabores suaves e refinados. As gorduras dos peixes são líquidas em temperatura ambiente, sendo frequentemente chamadas de óleos e possuem benefícios para a saúde humana. Devido a globalização de hábitos alimentares e da necessidade de inovação na gastronomia, uma rápida difusão de preparações com pescados, de diversas partes do mundo vem ocorrendo. Como exemplo disso, pode-se citar o sushi e o sashimi do Japão, o ceviche do Peru, o salmão gravlax da Escandináveia, o poke do Havaí. Essas são algumas das preparações que não são processados termicamente ou são preparados por técnicas que podem permitir a sobrevivência de microrganismos patogênicos. Evidenciando a importância de cuidados quanto a segurança, os peixes e frutos do mar estão entre os alimentos que mais contêm perigos para a saúde humana, os quais vão desde vírus e bactérias até parasitas, poluentes e toxinas. Além disso, esses alimentos são bastante suscetíveis à deterioração devido à elevada atividade da água, composição química, riqueza em gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e, sobretudo, ao pH próximo da neutralidade, que favorece o desenvolvimento de microrganismos. Neste capítulo, serão examinados os principais perigos dos pescados, os principais cuidados que devemos ter ao adquiri-los, manipulá-los e prepará-los com segurança.

### **Perigos dos pescados e como evitá-los**

Os perigos dos pescados podem ser de natureza biológica, química ou física. Os perigos químicos (ex. toxinas, histamina, antibióticos, entre outros) são

provavelmente os mais temidos pelos consumidores, enquanto os perigos físicos (ex. fragmentos de ossos, espinhas e pedras) são os mais facilmente identificados. Já os perigos biológicos (ex. bactérias e vírus) são os que provavelmente mais afetam a saúde pública. Por exemplo, uma espinha de peixe é um perigo físico e pode provocar lesões bucais nos consumidores, já a contaminação de ostras com *Salmonella* ou *Vibrio parahaemolyticus* pode afetar centenas de consumidores, levando muitos deles para o hospital. Por outro lado, perigos químicos como histamina, podem gerar efeitos adversos logo após a ingestão de pescados, causando coceira, formigamento e até pânico nos consumidores mais sensíveis, devido à dificuldade de respirar.

Abaixo são descritos alguns dos principais perigos físicos, químicos e biológicos dos pescados e suas formas de controle.

### **Perigos físicos:**

- **Espinhas:** estes perigos podem ser encontrados naturalmente em diversos tipos de peixes, principalmente se servidos inteiros. Os filés não devem ter espinhas, uma vez que os fornecedores ou cozinheiros devem realizar inspeções sensoriais pelo “toque” das mãos, para verificar sua ausência. Ainda assim, essas espinhas são frequentes em muitos pescados e, se possível, recomenda-se retirá-las com as mãos ou pinças, antes de servir preparações gastronômicas. Diversas pessoas têm de ir ao hospital para a retirada de espinhas de suas gargantas.
- **Areia e pedras:** esses perigos físicos podem ser encontrados em moluscos bivalves, como os mariscos, volgotes e ostras. Algumas pedras podem ser visíveis e tão grandes quanto o tamanho das conchas e esses são perigos com probabilidade muito baixa de produzir qualquer dano aos consumidores, porque são reconhecidos e retirados facilmente. Por outro lado, a areia não é tão fácil de ser percebida visualmente, mas a lavagem dos pescados com água potável sempre ajuda. Moluscos vivos podem ser deixados em aquários por várias horas, antes do consumo, a fim de contribuir com a retirada da areia deles.

- **Microplásticos:** devido ao descarte incorreto, entre 2% e 5% de todo o plástico produzido no mundo acaba sendo despejado nos oceanos, em forma de resíduo. Ali, esse material pode sofrer ação da luz ultra-violeta do sol e degradar lentamente, gerando microplásticos, ou seja, pequenas partículas de cerca de 0,01mm até cinco milímetros de comprimento. Essas pequenas partículas podem ser ingeridas por animais marinhos e, assim entram na cadeia alimentar. No fim da linha, nós, humanos, acabamos ingerindo esses plásticos. Até agora, o grau de risco dos microplásticos e compostos associados e a forma como eles são biomagnificados nas cadeias alimentares são pouco compreendidas. Ainda que eles sejam considerados substâncias inertes, acredita-se que pouca gente ou ninguém gostaria de ingerir plástico através de um refinado prato de pescados. Como evitar o consumo de microplásticos? É difícil responder essa pergunta, pois estudos já mostraram que 30% dos peixes amazônicos têm o intestino contaminado por microplásticos (PEGADO et al., 2018). O descarte correto do plástico no lixo é a melhor forma de microplásticos não chegarem nos oceanos e entrarem na cadeia alimentar. Além disso, recomenda-se adquirir matéria-prima (pescados) de fornecedores confiáveis, que apliquem as boas práticas de pesca, bem como, utilizar peixes que são cultivados em cativeiro, onde não há presença desse composto.

### **Perigos químicos:**

- **Biotoxinas marinhas:** a ingestão de frutos do mar contaminados pode causar diferentes sintomas, dependendo do tipo de toxina presente (pode ser de origem biológica ou química), de sua concentração e quantidade de produto consumido. Intoxicações alimentares são decorrentes da ingestão de biotoxinas marinhas, presentes em moluscos bivalves ou outros pescados crus ou mal-cozidos. Tecnicamente as biotoxinas são substâncias encontradas em organismos vivos, que causam, quando absorvidas ou ingeridas, mesmo em baixas concentrações, problemas relacionados à saúde humana. Todos os seres vivos, vegetais e animais, desde microorganismos unicelulares até àqueles mais complexos, podem

produzir ou acumular biotoxinas. Porém, de um modo geral, compreende-se que as biotoxinas são metabólitos secundários que estão geralmente relacionados com a função de inibição de predação ou são produzidos a partir de rotas biossintéticas diversas, sendo a real função, da grande maioria destes compostos, ainda desconhecida. No ambiente marinho, as biotoxinas estudadas, em sua grande maioria, são provenientes de microalgas tóxicas, encontradas no *plâncton*, representadas principalmente por algumas espécies de Dinoflagelados. Problemas relacionados à pesca, ambiente e saúde pública são observados constantemente em todo o planeta, principalmente aqueles envolvendo envenenamento pelo consumo de peixes e moluscos que tenham acumulado as toxinas dessas microalgas. Essas biotoxinas podem causar problemas graves à saúde humana, inclusive mortes. (IEAPM, 2009). Existem diversos tipos de biotoxinas marinhas (DSP, ASP, AZP, NSP, CFP), as quais podem causar sintomas que vão desde problemas gastrintestinais e musculares até cerebrais (amnésia) e neurológicos. As saxitoxinas (STXs) são conhecidas como uma das mais toxinas marinhas mais poderosas e são responsáveis pela intoxicação paralisante por moluscos (PSP).

- **Histamina:** A histamina é uma substância formada pela deterioração de peixes conservados em temperaturas de refrigeração inapropriadas. Bactérias presentes no próprio pescado podem degradar grupos carboxílicos do aminoácido histidina, produzindo a histamina. Embora a sua toxicidade seja considerada aparentemente baixa para os humanos, a presença de outras aminas biogénicas como a cadaverina, a tiramina e a putrescina atuam como amplificadores dos sintomas. Os principais peixes formadores de histamina, devido à alta quantidade de histidina, são os pertencentes à família Scombridae, como o atum, cavala, cavalinha e bonito, mas camarão e sardinha também podem ser envolvidos. Normalmente a intoxicação surge como um quadro clínico não severo de dermatite, urticária, náusea, vômito e diarreia. Dependendo da quantidade ingerida podem surgir quadros mais graves como urticária, asfixia, asma, rinite, choque anafilático com hipotensão arterial e morte. Logo, a histamina é um perigo à segurança de alimentos e deve ser

prevenida em preparações com pescados. No Brasil, o limite permitido para peixes é de 100mg/kg de tecido muscular (BRASIL, 2019a) para as espécies formadoras de histamina e a análise para determinação laboratorial pode ser cara, porque são necessárias análises por planos amostrais em laboratórios terceirizados. Sensorialmente, a histamina é imperceptível e não há como reconhecê-la no pescado durante seu preparo ou consumo. Depois de formada, a histamina não pode ser retirada dos peixes, pois é termoestável, sendo que nem mesmo temperaturas de esterilização podem eliminá-la. Medidas para evitar a formação da histamina são conservar os peixes em temperaturas próximas de zero (ECONOMOU et al., 2007), durante a captura, transporte e processo até o consumo. Como isso não depende dos restaurantes, é fundamental que os mesmos só comprem pescados de fornecedores confiáveis, com qualidade assegurada, e forte controle da cadeia de frio.

- **Metais Pesados:** os metais pesados, como por exemplo o chumbo, o mercúrio, o arsênio e o cádmio, não são biodegradáveis, permanecendo no ambiente durante muito tempo. A presença de metais pesados (chumbo, cobre, cádmio, arsênio e zinco) foi evidenciada no músculo e glândula digestiva dos polvos (*Octopus vulgaris*), robalos e sargos do estuário do Douro, em Portugal, e essa acumulação dependeu da qualidade da água e da dieta destes animais (CRUZ; MATEUS, 2010). A forma mais frequente de exposição dos humanos ao metilmercúrio (MeHg) é por consumo de pescados. O mercúrio contamina o pescado através de sua distribuição no ambiente. Esse metal pesado encontra-se em concentrações maiores nos peixes predatórios e mamíferos marinhos que se situam no topo da cadeia alimentar, como o peixe-espada e o tubarão. Os efeitos deletérios associados a este metal ocorrem nos sistemas cardiovascular, nervoso e urinário. O MeHg tem a capacidade de atravessar a placenta humana e provocar danos no sistema nervoso do feto, podendo gerar consequências como a diminuição das capacidades cognitivas das crianças. O cádmio, quando atinge níveis tóxicos no organismo humano, pode ser responsável por uma nefropatia

túbulo-intersticial. O chumbo provoca hematotoxicidade, neurotoxicidade e hipertensão arterial nas pessoas. O cobre foi utilizado na agricultura em alguns países, dadas as suas propriedades fungicidas, bactericidas e herbicidas. A intoxicação por cobre pode manifestar-se por vômitos e diarreias. A intoxicação por arsénio caracteriza-se por um quadro gastrointestinal agudo semelhante à cólera, podendo ainda causar problemas dermatológicos (RATNAIKE, 2003).

### **Perigos biológicos:**

- **Síndrome de Haff:** essa doença foi registrada pela primeira vez na Europa em 1924, mas não estava relacionada ao consumo de peixe. As causas da doença ainda estão sob investigação. Trata-se de um caso de rabdomiólise caracterizado pela destruição das células dos músculos esqueléticos, com liberação de mioglobina na corrente sanguínea, que sobrecarrega a função renal, afetando seriamente os rins e produzindo uma urina de coloração preta. As causas que podem levar à rabdomiólise são várias, mas ela tem sido atribuída a uma toxina de origem biológica, presente em algumas espécies de peixes. Casos graves podem levar à necessidade de hemodiálise por toda a vida. A doença também afeta o sistema muscular, causando astenia. A astenia muscular é caracterizada por exaustão, fraqueza muscular e uma sensação de falta de energia. Em março de 2021, a imprensa brasileira comunicou que uma pessoa hospitalizada há vários dias veio a falecer com o diagnóstico a “doença da urina preta”, conhecida como síndrome de Haff. Essa síndrome ocorreu após a ingestão de peixes conhecidos como “Arambaiana” ou “Olho de boi”. Outros relatos envolvendo o mesmo peixe e a doença foram registrados em Pernambuco, Bahia e Fortaleza. Além do peixe Arambaiana, a síndrome de Haff foi associada ao peixe Tambaqui. Embora esta doença seja rara, é necessário estar ciente da sua severidade, uma vez que em poucas horas após a ingestão do peixe com a toxina, os músculos esqueléticos, o fígado e principalmente os rins ficam comprometidos (FOOD SAFETY BRAZIL, 2020). A rabdomiólise em humanos também tem sido associada a compostos organofosforados

presentes em produtos agrícolas que, quando mal utilizados, entram nos cursos d'água que deságuam no mar, contaminando às áreas costeiras. Vale ressaltar que a toxina envolvida é estável ao calor, não sendo destruída pelo cozimento dos pescados. Logo, as principais formas de evitar o consumo dessa toxina é adquirir pescados de fornecedores com qualidade assegurada e respeitar a cadeia de frio, durante o transporte e o armazenamento.

- **Vírus:** há muitos tipos de vírus relacionados ao consumo de pescados e muitos deles provocam gastroenterites. Vários casos dessas síndromes estão relacionados ao consumo de moluscos bivalves, como gambas, vieiras, mexilhões, berbigão, ostras e preparados de pescado. Os sintomas típicos são diarreia severa acompanhada de vômitos. O vírus da hepatite A, por exemplo, pode ser transmitido por contato fecal-oral, podendo ser introduzido no pescado pelos manipuladores ou pela água contaminada com fezes, quando as práticas de higiene não são as melhores. Já os Norovírus, são responsáveis por um quadro de náuseas, vômitos (muitas vezes em jatos), diarreia e dores abdominais, por vezes acompanhados de dor de cabeça e febre. Água contaminada é a principal fonte de contaminação, mas os manipuladores também podem contaminar os alimentos através de um simples toque de mão, como ocorre na montagem de pratos. Como existe o hábito de tocar os alimentos prontos com as mãos, na gastronomia, vários surtos por Norovirus têm ocorrido, mesmo em restaurantes estrelados. Esse hábito pode e deve ser evitado, como ocorre em muitos restaurantes industriais e comerciais, nos quais não se toca nos alimentos prontos com as mãos, mas sempre com utensílios corretamente higienizados. Cabe ressaltar que a antissepsia das mãos (lavagem e desinfecção) deve ser frequente entre manipuladores e cozinheiros e isso diminui o risco de contaminações virais ou de outros microrganismos (TONDO; BARTZ, 2019).
- **Parasitas:** muitas espécies de peixes marinhos e de água doce são fontes de parasitas. Uma das principais causas de infestação de humanos é o consumo de peixe cru ou inadequadamente cozido, uma vez que o calor inativa os parasitas. Geralmente, os peixes são hospedeiros



intermediários e os humanos tornam-se os hospedeiros definitivos, após a ingestão dos parasitas. Entre eles se destaca o *Diphyllobothrium latum*, que causa a difilobotríase, doença intestinal de longa duração, uma vez que o parasita pode permanecer no intestino humano por cerca de 10 anos. Os sintomas apresentados podem ser dor e desconforto abdominal, flatulência, diarreia e, com menos frequência, vômitos, perda de peso e anemia por carência de vitamina B12. Pode haver oclusão da luz do intestino, devido ao grande número de parasitas, que podem alcançar vários metros de comprimento. As infecções também podem ser assintomáticas. *Diphyllobothrium* spp. sendo conhecido como a “tênia do peixe” (similar à “tênia do boi” e a “tênia do porco”). A doença ocorre em áreas onde é comum a ingestão de peixes crus ou mal-cozidos vindos de água doce ou salgada. Uma forma eliminar os parasitas em peixes é pela aplicação de calor ou submetê-los pelo processo de congelamento. Por exemplo, a Portaria 1109/2016, que aprova as exigências mínimas para produção, preparo e comercialização de sushis e sashimis no Município de Porto Alegre/RS, estabelece que “o pescado oriundo de captura em alto mar, destinado ao consumo cru ou cozido parcialmente, deverá, em alguma de suas etapas de produção e processamento na indústria de pescado, a fim de eliminar possíveis parasitas, ser submetido a processo de congelamento conforme uma das seguintes técnicas: -20°C, por no mínimo 24 horas, ou -35°C, por no mínimo 15 horas”. Já “o pescado oriundo de cativeiro (peixe de cultivo, o qual possui risco desprezível para parasitas), destinado ao consumo cru ou cozido parcialmente, poderá ser recebido e armazenado na forma refrigerada, com temperatura igual ou inferior a 3°C, desde que haja comprovação documental deste tipo de cultivo” (BRASIL, 2016). Além disso, aconselha-se adquirir pescados com procedência comprovada e acompanhados de nota fiscal (o que é importante para comprovar a procedência legal) e observar as condições de higiene do local de venda.

- **Bactérias patogênicas:** em resumo, são aquelas que podem causar doenças. Na Tabela 1 encontra-se os principais microrganismos patogênicos associados ao pescado e suas respectivas origens. Os patógenos presentes nos pescados podem causar: 1) intoxicação

alimentar, quando ocorre a ingestão da toxina elaborada pelo microrganismo no alimento, geralmente devido à exposição da preparação a temperaturas inadequadas (ex. *Staphylococcus aureus* ou *Clostridium botulinum*); 2) infecção alimentar, quando há ingestão do microrganismo viável (vivo), o qual se multiplica dentro da pessoa, podendo produzir toxina, invasão tecidual ou simplesmente provocar os sintomas de gastroenterite pelo contato com as células do intestino (ex. *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Vibrio parahaemolyticus*). As bactérias patogênicas podem contaminar os pescados através da contaminação da água ou podem fazer parte da microbiota dos próprios peixes, crustáceos e moluscos. Manipuladores, utensílios, equipamentos e gelo também podem ser importantes fontes de contaminação. A maioria das bactérias patogênicas (com exceção das esporuladas) será eliminada se os pescados forem aquecidos a 70°C ou mais e muitas delas também serão eliminadas pela acidificação (ex. no ceviche). A acidificação pode não eliminar todas as bactérias patogênicas presentes nos pescados, caso a contaminação seja muito alta. Mais uma vez, fica evidente a necessidade de utilização de pescados com qualidade assegurada dos fornecedores.

Tabela 1 – Microrganismos patogênicos associados ao pescado

Especies	Origem
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Ambiente, meio aquático.
<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Microbiota natural de animais e humanos
<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium botulinum</i>	Ambiente

Fonte: Adaptado de AMAGLIANI et al. (2012);

A contaminação por *Staphylococcus aureus* geralmente ocorre pela manipulação inadequada do pescado pelos funcionários. Manipuladores podem hospedar a bactéria em suas mãos, pele, cavidade oral e mucosa nasal e, durante o preparo, contaminar o alimento sem que este sofra alterações em sua aparência ou sabor. Este microrganismo pode causar intoxicação alimentar se o alimento for deixado em temperatura superior a 10°C, por algumas horas (TONDO; BARTZ, 2019).

*Clostridium botulinum* é um organismo anaeróbico, formador de endósporos. *C. botulinum* tipo E é encontrado no ambiente marinho e frequentemente isolado de peixes. Em geral, o pescado envolvido em intoxicações botulínicas é aquele processado pela salga, defumado, em molho escabeche, caviar e enlatados (JAY, 2005). Esse é um dos patógenos alimentares mais perigosos, o qual produz toxinas neurotóxicas, que podem matar em poucas horas, por asfixia. Dentre os primeiros casos de botulismo alimentar registrados no Brasil estão alguns que ocorreram em Porto Alegre/RS, em 1958. Nove pessoas de uma mesma família foram envolvidas em um surto, após o consumo de peixe (corvina) a escabeche em conserva. Sete pessoas morreram, o que é lembrado até hoje (TONDO; BARTZ, 2019).

*Escherichia coli* é uma bactéria frequentemente utilizada como indicador de contaminação fecal de águas e alimentos. Apesar disso, a maioria das bactérias dessa espécie não é patogênica, porém há linhagens que causam doenças. Em tanques de cultivo de pescado, há a possibilidade de cepas patogênicas de *E. coli* estarem presentes na água, o que podem levar à contaminação. Águas marinhas ou doces também podem estar contaminadas e, por esse motivo, essas bactérias frequentemente estão presentes em pescados crus. Os moluscos bivalves, como mariscos e ostras, filtram a água onde estão para se alimentar e assim podem concentrar grandes quantidades de bactérias que estavam na água. Preparar pratos com pescados crus pode ser muito chique, mas também perigoso se a procedência deles não for bem cuidada. Outras bactérias entéricas patogênicas, como a *Shigella spp.*, são eventualmente isoladas de tanques de cultivo e de pescados, mas, o risco de infecção através do consumo de peixe parece baixo (CABRAL, 2010).

A presença de *Salmonella* em pescados pode ser oriunda do ambiente aquático natural, especialmente em águas poluídas por esgoto ou excretas fecais de animais. A contaminação por essas bactérias também pode ocorrer na aquicultura ou durante o processamento (BESSER, 2018). No caso das preparações envolvendo pescados crus ou levemente cozidos, a *Salmonella* pode ser introduzida através da matéria-prima contaminada ou pela contaminação cruzada por utensílios e manipuladores. Uma cozinha higienizada e a antissepsia das mãos são fundamentais para diminuir esse risco.

Pelo menos doze espécies de *Vibrio* estão associadas a infecções humanas adquiridas pelo consumo de alimentos e água contaminados. O *V. parahaemolyticus* é encontrado na água do mar, principalmente em regiões costeiras, podendo causar infecções devido ao consumo de camarão marinho. No homem, esse microrganismo causa gastroenterite aguda, logo após o consumo (cerca de 30 minutos ou mais) de peixe cru, mariscos, camarões e ostras (LOPES; DA SILVA; TONDO, 2021).

Outro patógeno importante é a *Listeria monocytogenes*, microrganismo que pode causar mortalidade de 20 a 50% de indivíduos imunocomprometidos envolvidos em listerioses alimentares. Esse patógeno pode se multiplicar em temperaturas de 1°C a 45°C, a pH de 4,6 a 9,6 e pode sobreviver na superfície de alimentos e equipamentos, formando biofilme. Fontes de contaminação em pescados têm sido muitas vezes atribuído às plantas de processamento, sendo que a origem primária é o ambiente (RAMASWAMY et al., 2007). A capacidade de algumas cepas de se fixarem às superfícies pode permitir que essas bactérias persistam por longos períodos nos equipamentos e utensílios, contaminando o produto durante o processamento. Um importante pré-requisito para controlar a *L. monocytogenes* é o conhecimento e higienização adequada dos locais onde o microrganismo se aloja. Além do ambiente de processamento e preparo, o peixe cru (ex. salmão) também pode estar contaminado e tem sido considerado uma fonte importante desse microrganismo.

Uma vez que a maioria dos perigos biológicos acima citados não causam alterações visuais nos pescados, é importante lembrar que a grande maioria dos surtos ocorre com preparações com aparência normal, sem cheiro ou gosto

alterados. Nesse sentido, para garantir o consumo seguro de preparações à base de pescados, pode-se tomar algumas precauções, que estão listadas abaixo:

Compra: ao escolher o local onde que será comprado o pescado, preste atenção especial na procedência. Mercadorias sem procedência conhecida podem apresentar risco, uma vez que o produto não foi inspecionado. Peixes frescos podem ser excelentes, apresentando textura e sabor bastante valorizados pelos *chefs* e clientes, porém pode não estar seguros se não soubermos que vieram de locais com água não poluída. Além disso, os cuidados higiênicos de quem pesca e transporta os pescados devem ser rigorosos. O gelo utilizado nos barcos pesqueiros é feito com a água disponível, ou seja, do mar ou rio, e conforme a qualidade da mesma, a contaminação do pescado pode variar muito. É importante verificar a higiene do local de compra, além das condições adequadas de armazenamento e conservação do produto. Os peixes devem ser mantidos em uma temperatura entre 0°C e 3°C. Cada pescado apresenta uma aparência adequada que deve ser observada na hora da compra. Segundo o RIISPOA (BRASIL, 2017), o pescado fresco próprio para consumo deverá apresentar as seguintes características:

- Superfície do corpo limpa, com relativo brilho metálico;
- Olhos transparentes, brilhantes e salientes, ocupando completamente as órbitas;
- Guelras róseas ou vermelhas, úmidas e brilhantes, com odor natural, próprio e suave;
- Ventre roliço, não deixando impressão duradoura à pressão dos dedos;
- Escamas brilhantes, bem aderentes à pele e nadadeiras apresentando certa resistência aos movimentos provocados. Não devem ser viscosas;
- Carne firme, consistência elástica, de cor própria da espécie;
- Vísceras íntegras, perfeitamente diferenciadas;
- Cheiro suave e característico.

As embalagens também devem ser observadas na hora da compra. É importante que não estejam sujas, rasgadas ou furadas. Os rótulos dos alimentos embalados devem apresentar as seguintes informações obrigatórias:

- o nome do produto;
- nome e endereço do fabricante;
- lista de ingredientes;
- conteúdo líquido;
- lote;
- data de validade.

Caso o produto não apresente essas condições, informe a empresa responsável pela venda e faça a troca. Quando expostos em balcões, os peixes devem ser cobertos com espessas camadas de gelo. Pescados congelados devem estar armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ , e pode ser alternativas práticas para muitos pratos de gastronomia, haja vista que muitos atributos de qualidade não serão significativamente alterados pelo congelamento. Ainda que alterações possam ocorrer, elas são imperceptíveis para muitos de nós.

Armazenamento e transporte: recomenda-se que os pescados sejam comprados e imediatamente transportados para o local de preparação ou armazenamento. É preciso cuidar muito bem da temperatura, em função da fácil deterioração desses alimentos. O ideal é comprar os pescados e colocá-los no gelo para manter a temperatura baixa. A temperatura de refrigeração deve estar de  $0$  a  $3^{\circ}\text{C}$ . Caso o pescado chegue até o estabelecimento através de distribuidor, o ideal é que os produtos sejam congelados inteiros e protegidos por embalagens de primeiro uso. Não é indicado congelar espécies diferentes num mesmo recipiente ou embalagem. Além disso, é importante retirar as vísceras e as escamas da peça inteira, antes de colocá-la na geladeira. Como escrito acima, pescados congelados devem ser armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$  ou menos.

Pré-preparo: no caso de pescados congelados, atenção para o descongelamento, que deve ser realizado no refrigerador (temperatura menor que  $5^{\circ}\text{C}$ ). Ele não deve ocorrer em água corrente ou temperatura ambiente. As sobras devem ser guardadas imediatamente sob refrigeração, após as refeições. No caso do bacalhau, este deve ser dessalgado a uma temperatura menor que  $5^{\circ}\text{C}$ . O descongelamento também pode ser feito em micro-ondas, mas para consumo imediato: descongelou, preparou, comeu.

Preparo: se o foco é prezar pela segurança, os pescados devem ser preparados por métodos que elevem a sua temperatura acima de 70°C (BRASIL, 2004) ou outras temperaturas comprovadamente seguras. É sabido que muitas preparações gastronômicas não recomendam temperaturas elevadas para a preparação de pescados, devido a sensibilidade de suas carnes. Nesses casos, o ideal é validar a temperatura recomendada (quando for abaixo de 70°C), a fim de comprovar que patógenos podem ser eliminados. Isso pode ser realizado em laboratórios especializados, onde os patógenos de interesse serão inoculados nas preparações e essas serão submetidas ao tratamento térmico desejado. A sobrevivência dos patógenos será acompanhada para verificar a eficácia do processo. Isso é fácil e barato? Nenhum dos dois, mas é o modo profissional de agir. Microrganismos indicadores podem ser utilizados, ao invés dos patógenos, o que facilita e torna o estudo mais acessível. Outros padrões de tempo e temperatura seguros podem ser utilizados se recomendados por legislações, órgãos ou instituições reconhecidas. Cabe lembrar que, nesse caso, a fiscalização pode questionar tais parâmetros, caso eles não estejam na legislação vigente no local.

Legislação: No Brasil, Instrução Normativa nº60, de 23 de dezembro de 2019 (BRASIL, 2019a), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, define critérios microbiológicos para alimentos destinados ao consumo humano. O item 7 da citada resolução aborda os pescados e os produtos derivados da pesca bem como os limites microbiológicos para sua comercialização. Cada país importador estabelece seus próprios padrões microbiológicos e físico-químicos e cada empresa importadora tem também seus critérios de avaliação, geralmente de caráter sigiloso. No Brasil, o pescado antes de ser comercializado é fiscalizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ao sair da indústria, a responsabilidade passa para o Ministério da Saúde e, nos estados, para as respectivas secretarias. Todo controle e fiscalização de alimentos como o pescado envolve legislação própria (leis, decretos, resoluções, portarias e normas técnicas).

## **Preparações à base de pescados e cuidados direcionados à segurança de alimentos**

### **1. Preparações com pescados crus**

#### 1.1 Sushi e Sashimi

Atualmente, uma das formas mais populares e prazerosas de consumir peixe cru, provavelmente, é através dos sushis. O sushi é uma preparação tradicional da culinária japonesa, que consiste na maior parte de arroz cozido, acidificado com vinagre e resfriado, o qual é moldado em peças pequenas cobertas com peixe cru ou cozido, ou em formato de rolo contendo peixes ou legumes e, muitas vezes, envolto em algas marinhas (LIANG et al., 2016). Existem cinco tipos básicos de sushi: Nare, Nigiri/Edomae, Chirashi, Sugatha e Oshi/Osaka, os quais podem ser subdivididos em numerosas subcategorias. Dentre os diferentes tipos de sushi, o mais popular no mercado oriental é, provavelmente o Nigiri, que consiste no arroz temperado composto por uma fina camada de peixe cru. Já no mercado ocidental, o tipo mais popular é o Sushi Roll ou Maki Sushi. Ainda dentro da família de rolos de sushi, o Uramaki é, possivelmente, o mais popular entre os ocidentais. A popularidade dos sushis pode ser atribuída pela presença de ingredientes bastante familiares à cultura ocidental em sua composição e, também, por ser possível a opção de fritar certos sushis, acabando com a rejeição que certas pessoas tinham ao comer peixe cru. Isso ocorreu quando o sushi Nigiri foi introduzido no ocidente. A aceitação expressiva do sushi permitiu uma fusão entre a culinária japonesa e a ocidental, fazendo com que os sabores de ambas as culturas se entrelaçassem. Com o crescente consumo de sushi no mundo todo e a necessidade de inovar no mercado, muitos estabelecimentos alimentares viram os sushis como uma oportunidade para atrair mais clientes. No entanto, muitos deles não possuíam estrutura física, capacitação de funcionários e Boas Práticas adequadas para elaborar um prato típico da culinária japonesa. Além disso, um estudo feito em 2020 comprovou que entre os sushis Nigiri e Hosomaki, todos tipos de sushis continham contaminação bacteriana (o que é normal, desde que não excessiva e composta por patógenos, como *Salmonella*) e o sushi Uramaki demonstrou as maiores contagens



microbianas, o que ressalta a importância de controlar as boas práticas durante a preparação desses alimentos (DA SILVA et al., 2020).

A preparação de sushis envolve muita manipulação e o uso frequente de ingredientes crus, aumentando o risco de contaminação microbiana. Patógenos como a *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* podem ser introduzidos nessa preparação através da matéria-prima (principalmente os peixes) ou por contaminação cruzada, via utensílios e mãos dos manipuladores, sendo que há pouca ou nenhuma etapa de processamento térmico capaz de eliminar totalmente a contaminação microbiana.

Atualmente, poucos países e cidades possuem legislações direcionadas exclusivamente a segurança de sushis. Na Austrália, órgãos regulamentadores desenvolveram uma guia para empresas que comercializam sushi, a fim de ajudar a identificar e controlar os riscos associados a estes produtos. Durante a exposição no balcão de distribuição, é permitido o produto ficar em temperaturas de até 15°C por no máximo 4h, logo após a montagem das peças, desde que o arroz temperado esteja corretamente acidificado ( $\text{pH} < 4,6$ ) (MANITOBA HEALTH, 2013). Um estudo demonstrou que a acidez do arroz temperado, além de prevenir a multiplicação de eventuais patógenos, pode baixar o pH do peixe presente nos sushis (de 6,1 para 4,7), o que pode contribuir para a diminuição da velocidade da multiplicação microbiana geral da preparação, aumentando a sua vida de prateleira e segurança (DA SILVA et al., 2020). Nos EUA, a cidade de Nova York proibiu, em restaurantes de culinária oriental, a utilização de peixe fresco que não tivesse passado por congelamento prévio, devido a possível presença de parasitas nos peixes. Como visto, anteriormente, o congelamento adequado pode inativar parasitas, aumentando a segurança dos peixes consumidos crus.

No Brasil, atualmente, não existe uma regulamentação nacional referente à produção e comercialização de sushi. Apenas duas cidades brasileiras apresentam legislações municipais exclusivas para sushis. Em 2016 o município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, baseado na legislação da cidade de Nova York, foi o pioneiro no país ao elaborar uma legislação para estabelecimentos de sushis e sashimis (BRASIL, 2016). Em 2019, a cidade de Fortaleza também

lançou uma portaria com requisitos semelhantes (BRASIL, 2019b). Diversos parâmetros de segurança foram estabelecidos nesses regulamentos, como por exemplo:

- 1) a obrigatoriedade de congelamento prévio em peixes oriundos de alto mar, devido a possível presença de parasitas (os parâmetros de tempo e temperatura foram citados mais acima nesse capítulo ou podem ser observados na legislação);
- 2) a obrigatoriedade da acidificação e do controle do pH do arroz ( $\text{pH} \leq 4,5$ ), que permite sua conservação em temperaturas ambientais por até 24h, visto que em pH baixos ocorre pouca ou nenhuma multiplicação de patógenos, especialmente o *Bacillus cereus*.
- 3) a possibilidade de validação das temperaturas acima 5°C e tempos de exposição de sushis em *buffet*, desde que comprovado que os microrganismos presentes nos sushis não se desenvolveriam de forma significativa.

Entretanto, nenhuma das duas portarias cita parâmetros fixos de tempo e temperatura para a distribuição e exposição dos sushis e dos sashimis. De acordo com a legislação brasileira de boas práticas para serviços de alimentação (BRASIL, 2004), após serem submetidos à cocção, os alimentos preparados devem ser mantidos em condições de tempo e de temperatura que não favoreçam a multiplicação microbiana. Para conservação a quente, os alimentos devem ser submetidos à temperatura superior a 60°C por, no máximo, 6 horas. Aqui se enquadram os *hot* sushis, os quais são fritos, e os flambados. A mesma legislação estabelece que os alimentos que necessitam de frio devem ser conservados sob refrigeração a <5°C sendo distribuídos e consumidos em até 5 dias. No entanto, essa prática não é realizada em muitos estabelecimentos, que acabam expondo os sushis à temperatura ambiente, uma vez que temperaturas de refrigeração podem comprometer a qualidade sensorial (sabor) dessas preparações. No Japão, tradicionalmente, os sushis eram servidos em temperatura ambiente, uma vez que o hábito envolvia a preparação cuidadosa pelos *sushimen* e o consumo imediato pelos clientes. Aqui no Brasil e em outros países, a necessidade de distribuição de muitas peças de sushi resultou na sua exposição em *buffets*, o que pode comprometer a sua segurança. A experiência

prática demonstrou que os sushis podem ficar expostas em temperaturas ambientais elevadas por algumas horas, porém se ficarem expostos em temperaturas elevadas por períodos muito longos pode haver multiplicação microbiana, tornando os sushis inseguros.

Dessa forma, Da Silva *et al.*, (2020) desenvolveram um modelo matemático capaz de prever o comportamento de *Salmonella enterica* em sushi exposto a diferentes cenários de tempo e temperatura. Esse modelo foi construído por meio de dados encontrados em 27 estabelecimentos de sushi, de análises microbiológicas realizadas em laboratório e de *softwares* de microbiologia preditiva. O resultado do estudo demonstrou que a combinação de 6 h a  $\leq 15^{\circ}\text{C}$  poderia ser utilizada para distribuir sushi, considerando a contaminação por *Salmonella*. Mais estudos devem ser realizados a fim de prever a multiplicação de outras bactérias patogênicas, como *Listeria monocytogenes*, para determinar padrões de temperatura e tempo capazes de inibir a multiplicação de todos os patógenos que podem estar presentes no sushi. Conforme demonstrado anteriormente, legislações de países como Austrália já permitem que os sushis possam ficar expostos em temperaturas de  $15^{\circ}\text{C}$ , de forma segura. Assim, para garantir a segurança microbiológica de sushis é importante controlar as Boas Práticas durante toda a preparação e também a combinação tempo-temperatura na distribuição no balcão de sushi. Quando o peixe cru é servido sozinho, o nome da preparação é sashimi. Nesse caso, as BP de preparação devem ser também rigorosas e a temperatura distribuição em *buffets* não devem ultrapassar os  $5^{\circ}\text{C}$ , uma vez que não há arroz acidificado na preparação, o que poderiam acidificar o peixe cru conservando-o por um pouco mais de tempo.

## 1.2 Steak Tartare de Atum

O *Steak Tartare* de atum é uma derivação do *Steak Tartare* bovino, que é um prato de carne de gado crua e finamente picada, misturada com vários condimentos, e servida com uma gema de ovo crua. Embora ele seja lembrado pelo seu formato circular, isso não é obrigatório no preparo do tartar. O que irá caracterizar o prato é a utilização de ingredientes crus muito bem misturados. Não foram encontrados estudos científicos sobre esta preparação, mas por não ser submetido a nenhum tratamento térmico e nem ficar em contato com

componentes antimicrobianos que possam inativar patógenos, há dúvida que a preparação pode apresentar riscos. Ainda assim, as BP são importantes para não aumentar a contaminação, devido a manipulação inadequada. O que deve ser controlado acima de tudo é a procedência e qualidade das matérias-primas, principalmente do atum e do ovo cru. Também é importante a verificação do processo de congelamento do atum na indústria, o qual pode eliminar os ovos de parasitas, caso estejam presentes. As bactérias não serão eliminadas por esse processo.

### 1.3 Poke

No repertório mundial de pratos de peixe cru, as ilhas havaianas oferecem o *Poke*. A preparação apresenta pedacinhos de peixe cru (em cubos) misturados com outros ingredientes, tradicionalmente algas marinhas e nozes da Índia torradas. Atualmente o *Poke* é conhecido como um sushi aberto ou sushi de pote. Geralmente é servido como aperitivo ou como prato principal. As formas tradicionais têm atum e polvo, mas adaptações podem incluir salmão cru ou vários crustáceos como ingrediente principal, o que atualmente é uma forma mais conhecida. É importante salientar que, atualmente, os *Pokes* são montados imediatamente antes do consumo, de acordo com o gosto do cliente. O que pode variar é se ingredientes serão totalmente crus até cozidos. Alguns ingredientes crus são marinados, contendo molhos que podem ser ácidos ou ricos em sódio. Contudo, como o *Poke* é misturado e preparado momentos antes de seu consumo, provavelmente não haverá tempo o suficiente para ação antimicrobiana dos compostos da marinada. Dessa forma, assim como o *Steak Tartare* de atum, o *Poke* entra na categoria das preparações onde a escolha de fornecedores confiáveis é essencial, principalmente no caso dos peixes de alto mar, os quais devem passar pelo processo de congelamento para eliminar a presença de possíveis parasitas. Novamente, assim como no *Steak Tartare* de atum, as BP na preparação do *Poke* são importantes para não adicionar patógenos dos manipuladores, utensílios e da cozinha. Também não foram encontrados estudos científicos sobre esta preparação, mas por possuírem as mesmas características dos *Steak Tartare* de atum, há dúvidas quanto a sua segurança.

## **2. Preparações com pescados submetidos a tratamentos térmicos brandos**

### **2.1 Selagem, Cozimento Unilateral e Salmão com crosta de gergelim**

Realizar a selagem ou grelhar os peixes são técnicas de cocção em altas temperaturas. Devido à alta temperatura, o calor entra em contato apenas com as superfícies dos pescados, podendo ocasionar que o seu centro geométrico continue cru. Essas técnicas deixam as preparações mais seguras porque são capazes de eliminar a contaminação superficial da carne, mas não do seu interior, caso os pescados estejam contaminados. Novamente, a segurança da matéria-prima é fundamental, e o congelamento pode prevenir possíveis parasitas.

### **2.2 Salmão Defumado a Frio**

A preservação do pescado, por meio de defumação, teve sua origem nos primórdios da civilização. No entanto, no século 15, com a pesca de arenque no Mar do Norte, a defumação alcançou escalas industriais, com conseqüente evolução das técnicas utilizadas e o aperfeiçoamento de equipamentos. Atualmente, essa técnica é mais utilizada para melhorar o sabor e o aspecto visual do pescado. A defumação agrega valor ao produto, oferecendo uma maior viabilidade econômica para a indústria, porém não tão eficaz quanto aos outros métodos de conservação. O pescado defumado possui certa facilidade no preparo, porém possuem uma pequena produção por falta de oferta no mercado brasileiro. O Salmão Defumado a Frio é uma preparação que submete o peixe cru, inteiro ou em pedaços, a um processamento de fumaça a frio, produzindo um salmão pronto para consumo levemente preservado. A produção de Salmão Defumado a Frio pode ser realizada de duas maneiras: mergulhar ou pulverizar fumaça líquida no peixe ou a pirólise (queima) de lascas de madeira, sob o peixe cru, em um recipiente ou sala fechada. A fumaça da madeira possui vários compostos bioativos, dispersos como uma emulsão de gotículas na fase de ar e vapor. A fumaça da madeira também contém compostos fenólicos voláteis e outros fragmentos que contêm os aromas específicos. Ela também pode ter compostos antimicrobianos e antioxidantes que podem inibir a multiplicação de

certas bactérias e fungos e podem retardar a oxidação de gorduras. Após aplicada, o peixe fica armazenado sob refrigeração por alguns dias, e é utilizado conforme demanda. O nome “defumação a frio” significa que o peixe é submetido por uma temperatura branda (média 30°C – temperatura ótima que favorece a multiplicação de muitos microrganismos patogênicos) por períodos que variam de minutos a horas. Segundo a legislação, alimentos tratados termicamente devem atingir, no mínimo, 70°C, em todas as suas partes. Entretanto, temperaturas inferiores podem ser utilizadas, desde que assegurem a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos (BRASIL, 2004). De acordo com o RIISPOA (BRASIL, 2017), a definição de defumado é “produtos que após a cura são submetidos à defumação para fornecer cheiro e sabor, além de maior prazo de vida comercial por desidratação parcial. Esse processo deve ser realizado em estufas com a queima de madeiras não resinosas, secas e duras”. Alguns estudos já demonstram que a defumação correta diminui a carga microbiana de alimentos, além de criar uma película de proteção contra agentes externos, dessa forma, aumentando o seu prazo de validade. No entanto, ainda faltam estudos comprovando a segurança da preparação, a qual dependerá muito da carga microbiana inicial da matéria-prima. Como o peixe pode ficar armazenado por alguns dias na geladeira, pode haver a multiplicação de *Listeria monocytogenes*, caso esteja na matéria-prima. Dessa forma, é necessário a utilização de matérias-primas adequadas, vindas de fornecedores com boas práticas de fabricação. Além disso, é interessante realizar a validação da receita dessa preparação em laboratórios de análise de alimentos, de acordo com os parâmetros utilizados em cada estabelecimento (quantidade de ingredientes utilizados, tempo e temperatura de defumação e equipamento utilizado) a fim de avaliar se ocorre ou não a redução da carga microbiana devido a defumação.

### **3. Marinadas e Curas**

As marinadas podem ser classificadas como líquidos temperados utilizados para melhorar a maciez, palatabilidade, sabor, cor e/ou textura de diferentes carnes (bovina, frango, suína, peixes e frutos do mar). Marinar é o processo de incorporação ou imersão de carnes na marinada, que pode ser um líquido temperado cozido ou cru. Muito frequentemente ouve-se que o limão, presente

nas marinadas, “cozinha” peixes e frutos do mar em preparações como o ceviche, por exemplo. No entanto, essa definição está incorreta. Cozinhar significa por definição preparar (alimentos) através da ação do fogo ou de qualquer outro processo envolvendo calor. Desse modo, o limão sozinho, sem a ação do calor, não tem poder de cocção. O que ocorre com a estrutura de carnes em contato com o limão e outros alimentos ácidos é um processo de desnaturação proteica. A desnaturação das proteínas pode ocorrer por ação do calor, pH, presença de sais, presença de detergentes e presença de substâncias orgânicas. Deste modo, a carne do peixe que antes era translúcida e macia, se torna opaca e firme; mas a mudança é mais delicada que a ocorrida pelo calor e não produz nenhuma das modificações de sabor provocadas pela alta temperatura.

Ao longo dos anos, mais ingredientes foram incluídos nas marinadas e, gradualmente, o processo de preservação foi alterado para um processo de aromatização e amaciamento. Atualmente, as marinadas geralmente contêm sal, ácidos como vinagre, vinho, suco de limão ou lima, água, temperos e especiarias, aditivos derivados de plantas, açúcar, agentes antimicrobianos e intensificadores de aroma, variando muito conforme quem as prepara. Em geral, o uso desses ingredientes na formulação da marinada é importante para atingir as características sensoriais (textura e sabor), resultando em produtos interessantes. Por exemplo, o uso de ácido ajuda a quebrar o tecido conjuntivo das carnes, por isso ela ficará mais macia, e o uso de temperos e especiarias contribuem para o sabor.

Além das características sensoriais, algumas fontes (IBRAHIM et al., 2018; KARYOTIS; SKANDAMIS; JUNEJA, 2017; LOPES; DA SILVA; TONDO, 2021) apresentam que ácidos, especiarias e temperos também podem ter um impacto significativo sobre enzimas, multiplicação ou mesmo inativação de microrganismos patogênicos presente nas carnes. Esses efeitos podem ser atribuídos aos seus constituintes, como etanol, ácidos orgânicos, polifenóis e compostos antimicrobianos. No entanto, o comportamento de bactérias pode ser afetado de diferentes formas por vários fatores, como o tipo do ácido utilizado, sua concentração na forma dissociada, temperatura, tempo e armazenamento

da marinada, população inicial do patógeno, evolução da microbiota indígena, entre outros.

A cura é uma técnica que combina a adição de sal, açúcar, nitrito e/ou nitrato para fins de preservação, sabor e cor de certos alimentos. Algumas publicações chamam de salga o uso de sal isoladamente nos alimentos, mas reservam a palavra “cura” para o uso de sal com nitratos/nitritos. O uso de sal e açúcar para conservar alimentos remonta aos tempos antigos. Este processo tem sido tradicionalmente utilizado para desidratar vários alimentos, como carne, peixe e vegetais, o que ajuda a inibir a multiplicação microbiana. Também mostra um papel protetor nas reações oxidativas de lipídios e proteínas que contribuem para os sabores dos alimentos. Os ingredientes da cura podem ser esfregados na superfície do alimento, misturados em alimentos secos (cura a seco) ou dissolvidos em água (salmoura, cura úmida ou em conserva). Nos últimos processos, o alimento é submerso na salmoura até ficar completamente coberto. Em grandes cortes de carne, a salmoura também pode ser injetada no músculo.

### 3.1 *Carpaccio*

*Carpaccio* é uma preparação feita a partir de carne ou de peixe servido cru, cortado em finíssimas tiras, preparado de várias maneiras e é comumente servido como um aperitivo ou antepasto, mas também pode ser um prato principal. Alguns restaurantes têm utilizado o nome *Carpaccio* para qualquer prato de carne, peixe, fruta ou legumes finamente cortados. Os temperos podem variar, desde a habitual combinação de azeite, limão, sal e pimenta, até maioneses com sabores e molhos de mostarda. Apesar de entrar dentro da categoria dos frutos do mar marinados, o tempo em contato com os ingredientes é pequeno pois logo em seguida o prato é servido e consumido, fazendo com que, provavelmente, não haja tempo para uma ação dos ingredientes sobre os microrganismos dos peixes. Logo, a escolha da matéria-prima de fornecedores com procedência comprovada, bem como o bom uso das boas práticas são essenciais nessa preparação. Além disso, a higienização rigorosa do fatiador ou faca, antes de cortar os peixes, é essencial para evitar contaminação cruzada.



### 3.2 Ceviche

O ceviche é um prato típico da gastronomia Peruana e tem feito muito sucesso em todo o mundo por conta de sua praticidade de preparo e sabor inconfundível. Nos dias quentes, preparar uma receita de ceviche pode ser uma boa pedida para fazer uma refeição mais leve. É uma preparação que consiste em peixe cru misturado com legumes e marinado com suco de limão ou uma mistura de limão, e outros sucos cítricos. As receitas de ceviche variam entre países e culturas. A maioria das receitas utiliza tilápia (*Oreochromis niloticus*) como frutos do mar, mas também é possível encontrar ceviche de outros peixes brancos (linguado, salmão branco ou de garoupa) e de camarão e lula. Em restaurantes é servido como entrada ou prato principal.

Devido à falta de tratamento térmico dessa preparação, existe a possibilidade da presença de microrganismos patogênicos viáveis nessa preparação, os quais podem ser *Listeria monocytogenes*, *Vibrio*, *Escherichia coli* e *Salmonella*, entre outros. Algumas características da preparação podem agir contra esses microrganismos, mas deve-se considerar a possibilidade de sobrevivência deles. Os fatores que podem agir sobre patógenos no ceviche são o pH ácido do suco de limão (~2,5), a baixa temperatura de armazenamento durante a marinação, o corte do peixe (em cubos, o que aumenta a área de contato do mesmo com os outros ingredientes ácidos), o tempo de marinação (30-60-240 minutos) e os ingredientes utilizados (cebola, alho, sal, especiarias com possíveis ações antimicrobianas). Embora a utilização de ácidos, como o suco de limão, seja comumente associada à redução de bactérias, tal processo pode não ser suficiente para garantir a segurança do ceviche. Alguns estudos já demonstraram que a acidificação do ceviche não foi suficiente para eliminar totalmente os microrganismos patogênicos como *Vibrio*, *Escherichia coli* e *Salmonella* (FUCHS; SIRVAS, 1991; MATHUR; SCHAFFNER, 2013; REFUGIO TORRES-VITELA et al., 2000). Assim, alternativas devem ser propostas e analisadas cientificamente, a fim de ser possível a inativação de patógenos que porventura possam estar presentes no ceviche. A adição de novos ingredientes como, bebidas alcoólicas e ingredientes antimicrobianos ou, o uso de técnicas de processamento térmico brando, como *sous vide* podem ser alternativas para

umentar a segurança desta preparação. Dessa forma, a procedência e a qualidade assegurada dos ingredientes são pontos essenciais para a segurança dessa preparação. Além dela, a manipulação adequada e os utensílios corretamente higienizados são importantes para prevenir a contaminação. O pH ácido e o uso da refrigeração devem ser encarados como formas de inibir a multiplicação de patógenos, mas não necessariamente para inativá-los totalmente.

### 3.3 Salmão Gravlax

Salmão Gravlax ou Gravad lax, em sueco, “salmão curado” é uma especialidade da culinária escandinava, feita com salmão cru submetido a um processo de cura, através de uma mistura de sal grosso, açúcar e endro, embora possa haver acréscimo de outros temperos de acordo com diferentes receitas. O peixe é servido cortado em fatias, mais finas que as do sashimi japonês. Este método também de cura, pode ser utilizado para outros peixes gordurosos, mas salmão é o mais utilizado. Variações modernas podem incluir endro, pimenta branca, pimenta preta, sementes de coentro, raiz-forte, puré de beterraba e Aquavit ou outro destilado (vodka, conhaque, aguardente ou pastis). Geralmente, pedaços de salmão são cobertos pelo sal contendo esses ingredientes, enrolados em tecidos ou plásticos, pressionados com um peso, e então conservados em geladeira por períodos superiores a dois dias. A preparação não sofre tratamento térmico antes do consumo. O uso do sal inibe a multiplicação microbiana através da redução da atividade da água, além de criar uma textura mais densa na superfície. Ele também pode amaciar o salmão ao promover quebras da estrutura da proteína. A atividade de água pode ser reduzida para 0,86, que é a menor atividade de água necessária para o *S. aureus* produzir toxina. Ainda que patógenos não se multipliquem ou não produzam toxinas no Salmão Gravlax, eles também podem não ser inativados. Em experimento no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – ICTA/UFRGS, 5 log/g de *L. monocytogenes* foram inoculadas em cubos de salmão, os quais foram processados como Salmão Gravlax. Após três dias de cura, lavagem com água potável e armazenamento em geladeira (<5°C) por sete dias, o nível de *L. monocytogenes* permaneceu o mesmo. Resultados semelhantes aos

apresentados acima foram descritos por Namiq and Milne (2017), que reportaram que, embora a alta concentração de sal e baixa atividade de água do Salmão Gravlax possam contribuir para a inibição da multiplicação de muitas bactérias, esses parâmetros foram insuficientes para o controle de *Listeria monocytogenes*. Somado a isso, juntamente com a falta de tratamento térmico, o Salmão Gravlax é apontado como um potencial fonte de listeriose, o que já ocorreu na Suécia e na Finlândia (ERICSSON; STÅLHANDSKE, 1997; LONCAREVIC; THAM; DANIELSSON-THAM, 1996; PEIRIS et al., 2009).

### **Referências Bibliográficas**

BESSER, J. M. *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 71, p. 55–59, 2018. Disponível em: Acesso at: 25 Dec. 2019.

BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Brasil: Presidência da República - Casa Civil, 2017.

BRASIL. **Instrução Normativa nº60, de 23 de dezembro de 2019** de dezembro. [S. l.: s. n.], 2019a. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>. .

BRASIL. **Portaria nº 1109, de 23 de Agosto de 2016**. Brasil: Diário Oficial Porto Alegre, 2016.

BRASIL. Portaria nº 1405, de 05 de Dezembro de 2019. **Diário Oficial do Município**: p. 1–17, 2019b.

BRASIL. **Resolução RDC nº 216, de 15 de Setembro de 2004**. Brasil: Agência Nacional da Vigilância Sanitária, 2004.

CABRAL, J. P. S. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2010,

**Vol. 7, Pages 3657-3703**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 3657–3703, 2010. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/7/10/3657/htm>. Acesso at: 22 Oct. 2021.

CRUZ, A. R.; MATEUS, T. L. PERIGOS ALIMENTARES NO PESCADO Os perigos químicos ANICARE-Educate Animal Welfare as a Farming Opportunity View project Environmental Sciences and Surveillance View project. [s. l.], 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/319234347>. Acesso at: 22 Oct. 2021.

DA SILVA, D. C. *et al.* Mathematical modelling and validation of *Salmonella enterica* growth in sushi exposed to different time-temperature scenarios found in real sushi establishments. **Food Research International**, [s. l.], v. 136, p. 109609, 2020.

ECONOMOU, V. *et al.* Changes in histamine and microbiological analyses in fresh and frozen tuna muscle during temperature abuse. **Food Additives and Contaminants**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 820–832, 2007. Disponível em: Acesso at: 22 Oct. 2021.

ERICSSON, H.; STÅLHANDSKE, P. PCR detection of *Listeria monocytogenes* in “gravad” rainbow trout. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 281–285, 1997.

FUCHS, R. S.; SIRVAS, S. Incidence of *Listeria monocytogenes* in an acidified fish product, ceviche. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 88–90, 1991. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.1991.tb00512.x>. Acesso at: 30 Jun. 2020.

IBRAHIM, H. M. *et al.* Effect of Marination on *Vibrio Parahaemolyticus* in Tilapia Fillets. **BENHA VETERINARY MEDICAL JOURNAL**, [s. l.], 2018. Disponível em: <http://www.bvmj.bu.edu.eg>. Acesso at: 30 Jun. 2020.

IEAPM. **Batista, William Romão; Neves, Maria Helena Campos B. Biotoxinas marinhas**. [S. l.: s. n.], 2009.

JAY, J. **Microbiologia de Alimentos**. 6ªed. Porto Alegre: [s. n.], 2005.

KARYOTIS, D.; SKANDAMIS, P. N.; JUNEJA, V. K. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in sous-vide processed marinated chicken breast. **Food Research International**, [s. l.], v. 100, p. 894–898, 2017. Disponível em: Acesso at: 31 May 2020.

LIANG, W.-L. *et al.* The microbiological quality of take-away raw salmon finger sushi sold in Hong Kong. **Food Control**, [s. l.], v. 69, p. 45–50, 2016.

LONCAREVIC, S.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. L. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in Smoked and “Gravad” Fish. **Acta Veterinaria Scandinavica**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 13–18, 1996.

LOPES, S. M.; DA SILVA, D. C.; TONDO, E. C. **Bactericidal effect of marinades on meats against different pathogens: a review**. [S. l.]: Bellwether Publishing, Ltd., 2021.

MANITOBA HEALTH. **Food safety guidelines for the preparation of sushi**. Manitoba: [s. n.], 2013.

MATHUR, P.; SCHAFFNER, D. W. Effect of lime juice on *vibrio parahaemolyticus* and *salmonella enterica* inactivation during the preparation of the raw fish dish ceviche. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 76, n. 6, p. 1027–1030, 2013. Disponível em: [http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/76/6/1027/1687212/0362-028x\\_jfp-12-526.pdf](http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/76/6/1027/1687212/0362-028x_jfp-12-526.pdf). Acesso at: 30 Jun. 2020.

NAMIQ, K.; MILNE, D. Effect of Fillet Thickness on Quality and Shelf Life of Gravlax Salmon. [s. l.], 2017. Disponível em: <http://medcraveonline.com>. Acesso at: 2 May 2021.

PEGADO, T. de S. e. S. *et al.* First evidence of microplastic ingestion by fishes from the Amazon River estuary. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 133, p. 814–821, 2018.

PEIRIS, I. P. *et al.* Gravad (Gravlax) and cold-smoked salmon, still a potential source of listeriosis. **Journal of Foodservice**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 15–20, 2009.

RAMASWAMY, V. *et al.* *Listeria*--review of epidemiology and pathogenesis. **undefined**, [s. l.], 2007. Disponível em: Acesso at: 14 Jul. 2020.

RATNAIKE, R. N. Acute and chronic arsenic toxicity. **Postgraduate Medical Journal**, [s. l.], v. 79, n. 933, p. 391–396, 2003. Disponível em: <https://pmj.bmj.com/content/79/933/391>. Acesso at: 22 Oct. 2021.

REFUGIO TORRES-VITELA, M. *et al.* Survival of *Vibrio cholerae* O1 in Ceviche and Its Reduction by Heat Pretreatment of Raw Ingredients. *Journal of Food Protection*. [S. l.: s. n.], 2000. Disponível em: [http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/63/4/445/2204370/0362-028x-63\\_4\\_445.pdf](http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/63/4/445/2204370/0362-028x-63_4_445.pdf). Acesso at: 30 Jun. 2020.

TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. 2ª edição. Porto Alegre: [s. n.], 2019.

## 8. CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o comportamento de patógenos em preparações gastronômicas à base de ovos e peixes, sendo elas: *eggnog*, *tiramisù* e ceviche, uma vez que ainda não foram encontrados trabalhos científicos sobre inativação de patógenos nessas preparações, bem como consolidar os principais perigos dos pescados e os cuidados que devemos ter ao adquiri-los, manipulá-los e prepará-los com segurança.

No capítulo 2, foi investigada a influência de dois tratamentos térmicos (suave: 70°C; elevado: 80°C e 70°) na sobrevivência de *Salmonella* na bebida *eggnog*. A escolha desta preparação se deve ao fato de que ovos são ingredientes amplamente utilizados na gastronomia e quando não processados termicamente podem representar um risco potencial de contaminação por *Salmonella*. O *eggnog* é uma bebida consumida há muitos anos pelos americanos e britânicos, tradicionalmente servida na ceia de Natal, muito semelhante a gemada, mas em alguns casos, adicionada de álcool (geralmente o rum) e também levemente aquecida, devido à época fria do ano, nesses países (THE SPRUCE EATS, 2021). Ela é preparada através da batedura das gemas com açúcar, até o dobro de seu volume, e depois incorporado de leite, creme de leite, canela em pó, sal e noz-moscada. O elevado teor de açúcar da preparação e a incorporação de ar na mistura, através da batedura das gemas, bem como a adição de bebida alcoólica nesta bebida, são fatores popularmente disseminados por promover a inibição da multiplicação bacteriana. No Brasil, essa preparação é comumente conhecida como gemada, e o seu consumo era habitual antes da década de 90, quando era comum e habitual ingerir ovos crus. Atualmente ainda é muito consumida em cidades do interior. Uma das razões para a valorização e consumo dessa bebida é o sabor único e complexo que as gemas adoçadas adquirem, como também a memória de tempo de infância ao consumi-la quando se estava doente, feita pelos nossos pais ou avós. O processo de batedura, no qual as gemas são submetidas a uma quantidade generosa de açúcar resultam em uma transformação sensorial significativa. Juntamente com a aplicação de calor da bebida, que a deixa com uma sensação de proximidade e afeição por quem a consome. Dessa forma, foi investigado o

comportamento de *Salmonella* na bebida *eggnog* tradicional, com dois tratamentos térmicos diferentes aplicados e com a adição de bebida alcoólica (rum), analisando a sobrevivência desse patógeno durante o processo de armazenamento sob refrigeração (5°C) e a temperatura ambiente (25°C) por 5 dias, e a eficácia de diferentes tratamentos térmicos posteriormente aplicados.

Dentre uma variedade de receitas de *eggnog* encontradas na literatura e na *internet*, a bebida foi preparada de três formas diferentes, a partir de um compilado desses achados, os quais apresentavam métodos capazes de redução microbiana, chamados de cenários A, B e C. O cenário A é apenas a mistura de todos os ingredientes, sem adição de rum e sem adição de nenhum tratamento térmico. Este cenário foi realizado com o objetivo de avaliar apenas o efeito do álcool na sobrevivência de *Salmonella* (receita clássica), sem nenhum tratamento térmico. O cenário B consistiu em aplicar um tratamento térmico brando na mistura de leite (leite, creme de leite, e especiarias), aquecendo-a em fogo baixo até atingir 70°C, e depois verter sobre as gemas batidas com açúcar previamente, a fim de verificar qual seria a temperatura das gemas em contato com esta mistura e se este calor seria o suficiente para reduzir ou talvez inativar *Salmonella*. Além disso, foi avaliado o comportamento do microrganismo ao longo de sua vida útil. Enquanto o cenário C, além de aumentar a temperatura da mistura de leite até 80°C, após haver a mistura do líquido com as gemas e açúcar, a bebida como um todo voltou ao fogo e foi aquecida novamente até atingir 70°C, a fim de avaliar o comportamento da *Salmonella*, na bebida *eggnog*, com o aumento da temperatura. Nos cenários onde houve aquecimento térmico (B e C), termopares do tipo K foram inseridos na gema do ovo a fim de acompanhar o perfil de temperatura durante o processo.

Em geral, os resultados dos perfis de temperatura dos cenários B e C do *eggnog* durante seu preparo e seu armazenamento por 24 horas a 5°C foram semelhantes. Porém, no cenário C, onde houve dois aquecimentos sequenciais, promoveu um maior aquecimento em menor tempo quando comparado ao cenário B. Quando as bebidas foram levadas para refrigeração, a preparação submetida ao tratamento térmico brando (B), levou aproximadamente 50 minutos para atingir a temperatura de refrigeração (5°C) enquanto no tratamento térmico



elevado (C), a bebida demorou aproximadamente 300 minutos para atingir a mesma temperatura.

Os resultados microbiológicos obtidos no estudo indicaram que nenhum dos cenários promoveu a inativação completa de *Salmonella* (aproximadamente 8,5 log UFC/ml). As quantidades de bebida alcoólica utilizadas no preparo do *eggnog* não foram eficazes contra *Salmonella*. Mesmo quando foram aplicados tratamentos térmicos, as células de *Salmonella* foram recuperadas durante o armazenamento (5°C e 25°C), provavelmente devido às quantidades de açúcar e gordura presentes nesta bebida, o que tende a aumentar a resistência ao calor. Além disso, o armazenamento em temperatura ambiente para consumo posterior não é recomendado, devido à capacidade das células remanescentes se multiplicarem e atingirem contagens elevadas.

Com base nos resultados, se o *eggnog* for preparado com alto teor de *Salmonella* na gema de ovo, a bebida pode não ser segura para o consumidor. Assim, para melhorar a segurança desta bebida, é aconselhável a utilização de gema de ovo pasteurizada ou termoprocessada. Ovos não processados, provenientes de granjas controladas, ou seja, que passam por indústrias inspecionadas por órgãos competentes e mantidos em cadeia de frio, geralmente não apresentam ou apresentam baixos números de *Salmonella*, ou seja, 1 a 3 log UFC/g, e podem ser suficientes para eliminar completamente *Salmonella* e promover a segurança da bebida quando utilizado um elevado tratamento térmico (80°C e 70°C) durante o seu preparo. Em resumo, é aconselhável adquirir ovos provenientes de granjas e indústrias inspecionadas, preparar o *eggnog* com um tratamento térmico eficiente (80°C e 70°C) e consumir imediatamente.

No capítulo 3, foi analisado o comportamento de *Salmonella* na sobremesa *tiramisù* durante seu armazenamento sob refrigeração (5°C). Essa é uma típica sobremesa Italiana e, tradicionalmente, não leva nenhum tratamento térmico durante o seu preparo. Similarmente à bebida *eggnog*, na sobremesa *tiramisù*, as gemas também são utilizadas cruas e batidas com açúcar até dobrar o seu volume. A sua elaboração envolve uma montagem dos ingredientes em um recipiente. Em paralelo a manipulação das gemas com açúcar, uma mistura com

os demais ingredientes perecíveis (queijo mascarpone, creme de leite fresco) é realizada e, após, realiza-se a montagem da sobremesa com lascas de biscoito champagne embebidas em café solúvel e uma bebida alcoólica (neste estudo foi utilizado novamente o rum) e, de finalização, é polvilhado com cacau em pó sob a sobremesa, a qual é levada armazenado sob refrigeração até o seu consumo. A bebida alcoólica mais comumente utilizada no *tiramisù* é o vinho Marsala. No entanto, recentemente, devido à valorização de ingredientes artesanais e técnicas tradicionais na gastronomia, assim como a busca por novas experiências e sabores inovadores, os *chefs* estão preparando essa receita e substituindo a tradicional bebida alcoólica utilizada, o vinho Marsala, por bebidas alcoólicas regionais e economicamente mais viáveis, como é o caso do rum, que também foi utilizado na preparação anterior, a bebida *eggnog*. Assim como as receitas do *eggnog*, a sobremesa *tiramisù* possui diversas variações para serem testadas. Desta forma, foram realizados três métodos diferentes da receita. O primeiro, a receita clássica, retirada do livro do Le Cordon Blue, onde a gema de ovo foi utilizada de forma crua. A segunda, onde foi adicionada o rum como bebida alcoólica, em uma etapa diferente do tradicional, em contato direto com a gema de ovo contaminada por 30 minutos antes da incorporação do açúcar. E a terceira, através da sugestão de alguns *chefs* que uma forma segura de consumir preparações doces à base de ovos, não submetidas a tratamentos térmicos e mantendo a sua originalidade e aspecto sensorial, é incorporar uma calda de açúcar previamente aquecida (~71°C) sob as gemas de ovo cruas. No estudo anterior, discutido no capítulo 2, foi avaliada a sobrevivência de *Salmonella* na bebida *eggnog*, a qual em um dos cenários foi submetida a um tratamento térmico brando (70°C) e outro mais severo (80°C e 70°), sendo que a melhor redução (~5,0 log UFC/g) foi alcançada quando o tratamento térmico mais elevado foi aplicado. A partir deste resultado, de variações da receita do *tiramisù* encontradas na *internet*, da variação da perda de temperatura da gema de acordo com o material utilizado (por exemplo inox x plástico), e de experimentos realizados previamente em bancada, que demonstraram que a calda quente sobre as gemas, “perdia” temperatura muito rápido fazendo com que as gemas não atingissem a mesma temperatura em que a calda foi aquecida, a calda de açúcar foi aquecida até 90°C (temperatura esta superior ao que é preconizado pelos órgãos regulamentadores como forma segura de

aquecimento em alimentos (70°C) (BRASIL, 2004; CDC, 2011). Ademais, de acordo com os achados microbiológicos deste mesmo estudo, também foi testado um quarto método, onde a calda de açúcar foi aquecida até 121°C, temperatura considerada de esterilização comercial. Nos métodos 3 e 4, onde foram aplicados calor na preparação, assim como no estudo anterior (capítulo 2), termopares do tipo K foram inseridos na gema do ovo a fim de coletar o perfil de temperatura durante o processo.

Como esperado, o método 4 (calda a 121°C) promoveu um maior aquecimento da gema, que chegou a atingir 100.4°C, ao mesmo tempo que, quando a gema foi aquecida até 90°C, a maior temperatura que a mesma atingiu foi 89,1°C. Além disso, um fator relevante observado foi o tempo em que a gema permaneceu acima de 70°C em cada uma das temperaturas testadas. Quando a calda foi aquecida até 90°C, a gema permaneceu 180s (3 minutos) acima de 70°C, enquanto o aquecimento da calda foi 121°C, a gema permaneceu por 267s (4,45 minutos) acima de 70°C.

Os resultados microbiológicos apontaram que nenhuma das receitas realizadas foi capaz de eliminar completamente a *Salmonella*, exceto quando o método 4 foi aplicado. No método 1, onde a sobremesa é realizada de acordo com sua receita original (sem nenhum tratamento térmico), pode-se dizer que apenas houve uma diluição das células bacterianas junto aos ingredientes da receita, reduzindo em torno 1,6 log UFC/g da contaminação inicial (8,5 log UFC/g). No método 2, quando houve um contato direto de 30 minutos da gema contaminada com o rum, ocorreu uma redução maior das contagens de *Salmonella* em comparação com o Método 1 (6.25 log UFC/g). Em ambos os métodos, a sobremesa após 24, 48, 72, 96 e 120h, as contagens de *Salmonella* se mantiveram praticamente constantes. As reduções encontradas neste estudo estão de acordo com o que foi observado no estudo anterior sobre a bebida *eggnog* (capítulo 2), uma vez que em ambos os estudos o teor alcoólico de rum adicionado nas preparações (0,4%ABV no *eggnog* e 2,02%ABV no *tiramisù*) não foi suficiente para eliminar completamente *Salmonella*. Reforçando novamente a necessidade de outro método ser aplicado nessas preparações, a fim de torná-las seguras para o consumo, como por exemplo, a aplicação de um tratamento térmico.

Como esperado, quando aplica-se alterações na receita, adicionando-se tratamentos térmicos, os resultados são mais promissores. No método 3, no tempo 0, as contagens de *Salmonella* foram reduzidas para 1,60 log UFC/g, sendo grandemente reduzidas. Entretanto, ao armazenar a sobremesa sob refrigeração, as células conseguem se multiplicar devido ao ambiente ideal (açúcar e gordura), atingindo 4,65 log UFC/g em 5 dias, mesmo a temperatura da gema atingindo 70°C e permanecendo acima por 180 segundos (3 minutos). De acordo com este resultado, foi identificada a oportunidade de testar outro método, o Método 4, o qual mantém a gema acima de 70°C (ou seja, ~121°C) por mais tempo (267 segundos ~ 4,45 minutos) demonstrando ser capaz de inativar completamente todas as células de *Salmonella* inoculadas, o qual foi confirmado através do teste de inativação completa, que contempla o retorno dessa gema previamente testada para a estufa a 37°C por mais 24 h, a fim de verificar a multiplicação ou não de alguma possível célula remanescente. Entretanto, conforme orientado pelos *chefs*, temperaturas de calda de açúcar superiores a 71°C podem levar ao superaquecimento da gema, podendo comprometer a qualidade sensorial da preparação. Desta forma, com base nesses achados, o método 4 foi o único capaz de eliminar *Salmonella* na sobremesa *tiramisù*, porém a sua viabilidade deve ser discutida e testada por *chefs*. Caso contrário, o método 3 também é viável de ser utilizado, uma vez que os ovos utilizados sejam provenientes de granjas e indústrias que passam por inspeção sanitária e, desta forma, caso possuam uma contaminação por *Salmonella*, sendo a mesma baixa (~1 a 3 log UFC/g), seria facilmente eliminada pela calda quente a 90°C, sendo uma opção viável para reproduzir a sobremesa de forma segura para o consumo em residências e em restaurantes, quando a utilização de ovos pasteurizados e/ou termoprocessados não é uma possibilidade ou é inviável, devido ao elevado custo e curto prazo de validade, sendo descartado com frequência.

No capítulo 4 foi avaliado o comportamento de *L. monocytogenes* na preparação ceviche. O ceviche é preparado basicamente através da marinação do peixe em suco de limão, junto de alguns ingredientes que conferem sabor a preparação, como pimenta, coentro e sal e também o neutralizando a acidez do suco do limão, como é o caso da cebola roxa. De acordo com o dito popular, o

limão “cozinha” o peixe, mantendo-o assim seguro para o consumo. Conforme os resultados de pH, medidos em diversos tempos de marinação, foi possível observar que há uma redução significativa de 2,96 do pH do peixe (7.31) quando a adiciona-se o suco de limão (2.58). Além disso, enquanto o peixe fica marinando com o suco de limão e demais ingredientes, o pH do peixe vai reduzindo em até 4,17 após 120h de marinação. Entretanto, era necessário pesquisar se essa acidez reduziria as contagens de *L. monocytogenes*. Os resultados microbiológicos do ceviche demonstraram que em todos os tempos de marinação, houve reduções do patógeno. Entretanto, reduções significativas só foram observadas a partir de 24h de marinação. E a maior redução 3.34 log UFC/g, foi observada após 120h de marinação sob refrigeração (<4°C). Contudo, tempos elevados de marinação visivelmente afetaram a aparência do peixe, o que pode ser um ponto negativo para os consumidores.

Por outro lado, métodos alternativos foram aplicados a fim de verificar a eficácia dos mesmos contra a *L. monocytogenes*, como forma de promover a segurança do ceviche, uma vez que de acordo com os resultados microbiológicos obtidos previamente, não foi possível identificar a inativação completa do patógeno. Para isso, foi testada a aplicação do suco de limão e de um tratamento térmico brando a 50°C por 30 minutos (*sous vide*) na tilápia crua previamente contaminada de *L. monocytogenes* (8-9 log UFC/g). Esses tratamentos foram usados individualmente, em sinergia em sequências diferentes. Os resultados microbiológicos indicaram reduções em todos os métodos testados, sendo a maior redução observada na aplicação de suco de limão e posterior aplicação de *sous vide*, provavelmente devido a ação do ácido cítrico na membrana celular do patógeno, a qual ficou fragilizada quando foi houve a aplicação do *sous vide* (LOPES; DA SILVA; TONDO, 2022). E, a menor redução observada, foi identificando quando utilizado apenas o *sous vide* na tilápia contaminada (<0,86 log UFC/g), indiciando uma maior resistência térmica da *L. monocytogenes*.

Ademais, foi utilizada a ferramenta MALDI/TOF-MS na avaliação da microbiota da tilápia utilizada nessa preparação, com o objetivo de orientar qual conduta seguir frente aos microrganismos presentes. De acordo com os resultados, foram identificados microrganismos associados à deterioração do

peixe pelo frio, os quais podem fazer parte da microbiota do trato gastrointestinal de humanos e animais saudáveis e também podem sobreviver em diversos ambientes, incluindo solos e ambientes aquáticos, bem como bactérias potencialmente degradadoras de peixes, onde não foi identificada nenhuma alteração visual e aparente do peixe. Além disso, foi possível identificar a presença de *L. monocytogenes* na tilápia crua, após a marinação e após a aplicação de tratamento térmico. Validando novamente nossos achados microbiológicos, onde foi possível observar a redução das contagens deste patógeno, porém não sua inativação completa. De todo modo, foi possível identificar que as tilápias analisadas eram provenientes de fornecedores adequados. Embora tenha sido identificada a presença de *L. monocytogenes* no peixe cru adquirido em mercado local, a quantidade encontrada (1,93 log UFC/g) estava dentro dos limites permitidos por legislação (até 2 log UFC/g) em produtos prontos para o consumo, a qual se inclui a tilápia (BRASIL, 2022).

Com base nesses apontamentos e uma vez que *L. monocytogenes* é um patógeno de alto risco com uma taxa de mortalidade significativa, os resultados deste estudo sugerem que o consumo de ceviche preparado com receitas tradicionais não garante uma preparação segura e apresenta risco à saúde dos consumidores, uma vez que em todos os tratamentos testados as contagens permaneceram >2 log UFC/g. Portanto, outros métodos devem ser considerados e analisados em estudos futuros para tentar a inativação completa de *L. monocytogenes* nesta preparação, visando garantir a segurança do consumidor.

No capítulo 5, foi avaliado e descrito o estado atual do conhecimento da utilização e segurança de pescados e preparações envolvendo pescados na gastronomia. Foram abordados quais são os principais perigos físicos, químicos e biológicos que podem ser encontrados neles, desde o mais conhecido como as espinhas, que podem ser identificadas a olho nu, a histamina e metais pesados, até a possível presença de vírus e bactérias patogênicos. Dentre as bactérias patogênicas que podem ser encontradas nos pescados crus ou mal-cozidos, o capítulo descreveu as principais, sendo elas o *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum*, e também foi detalhada as condições ideais para a multiplicação delas,

destacando que a sua presença não pode ser identificada a olho nu e nem pela aparência ou odor dos pescados.

Após a revisão sobre as bactérias, o capítulo abordou, com base em artigos científicos, as precauções e cuidados na compra, manipulação e preparo de receitas com pescados, a fim de garantir a segurança dos alimentos. No momento da compra, o capítulo recomendou adquirir pescados de origem conhecida e inspecionados por serviços oficiais, verificando se possuem o selo de inspeção, e se os peixes, caso sejam adquiridos frescos, devem possuir aparência adequada, como: superfície do corpo limpa, com relativo brilho metálico; olhos transparentes, brilhantes e salientes; com odor natural, próprio e suave e característico. Em pescados embalados, as embalagens também devem ser observadas no momento da compra, sendo importante observar se não estão sujas, rasgadas ou furadas e os rótulos devem apresentar algumas informações obrigatórias, como nome do produto, nome e endereço do fabricante, lista de ingredientes, lote, data de validade e o selo de inspeção sanitária. Após a compra, o capítulo sugeriu que os pescados sejam imediatamente transportados para o local de preparação ou armazenamento, sendo necessário cuidar muito bem da temperatura, em função da fácil deterioração dessa matéria-prima. Para pescados frescos, a temperatura de refrigeração deve estar de 0 a 3°C e para congelados devem ser armazenados a -18°C ou menos. No pré-preparo, foi dada uma atenção especial para o descongelamento deste produto, que deve sempre ocorrer sob refrigeração (temperatura menor 5°C), sendo proibido ocorrer em água corrente ou temperatura ambiente. Já no preparo, os pescados devem ser elaborados por métodos que elevem a sua temperatura acima de 70°C (BRASIL, 2004) ou outras temperaturas comprovadamente seguras. É sabido que muitas preparações gastronômicas não recomendam temperaturas elevadas para a preparação de pescados, devido a sensibilidade de seus tecidos, bem como a naturalidade do consumo cru de algumas receitas clássicas. Como discutido nos capítulos anteriores, matérias-primas de origem animal, como os ovos e especialmente os peixes neste capítulo, provenientes de indústrias que passam por inspeção sanitária e são mantidos em cadeia de frio, possuem menores probabilidades de estarem contaminados com altas contagens de patógenos alimentares, o que pode contribuir para uma redução

ou possível inativação completa do microrganismo em preparações submetidas a tratamentos térmicos menores que 70°C. De qualquer forma, nesses casos, o ideal é validar a temperatura recomendada (quando for abaixo de 70°C), conforme sinaliza a legislação, a fim de comprovar que patógenos podem ser eliminados. O capítulo orienta que essa validação pode ser realizada em laboratórios especializados, onde os patógenos de interesse serão inoculados nas preparações e essas serão submetidas ao tratamento térmico desejado. A sobrevivência dos patógenos será acompanhada para verificar a eficácia do processo.

Na sequência, o capítulo abordou diferentes preparações com pescados com ênfase na preocupação com a contaminação pelos principais microrganismos, os quais foram citados anteriormente, a partir de dados de surtos que ocorreram pelo mundo e propondo, quando possível, alternativas viáveis para torná-los seguros para o consumo. As preparações foram divididas em três grupos, de acordo com a forma de preparo: Preparações com pescados crus (Sushi e Sashimi, *Steak Tartare* de Atum e *Poke*); Preparações com pescados submetidos a tratamentos térmicos brandos (Selagem, Cozimento Unilateral e Salmão com crosta de gergelim e Salmão Defumado a Frio); Marinadas e Curas (*Carpaccio*, Ceviche e Salmão *Gravlax*). Em resumo, independente da preparação, o capítulo recomendou a verificação e utilização de matérias-primas de qualidade e de procedência. Por fim, o capítulo destacou a importância de higienizar utensílios e superfícies que entrem em contato com os pescados crus e a importância da manutenção da temperatura adequada ao servir e transportar os mesmos, com o intuito de evitar a contaminação e multiplicação por patógenos.



## 9. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As receitas e as variações nos métodos de preparo para as preparações à base de ovos e peixes deste trabalho, foram encontradas em livros clássicos de gastronomia bem como por meio de buscas na *internet* e consulta com *chefs*, uma vez que atualmente há diversas variações de receitas clássicas. As principais variações encontradas no *eggnog* e no *tiramisù* foi a variedade de bebidas alcoólicas incorporadas nas receitas e seus respectivos volumes, tal como a aplicação de diferentes tratamentos térmicos a fim de torná-las seguras para o consumo, porém sem comprovações científicas sobre cada método utilizado. Em relação ao ceviche, a principal variação da preparação foi somente em relação aos tempos de marinação do peixe junto aos demais ingredientes da preparação. Porém, os tratamentos alternativos aplicados foram encontrados em buscas através de artigos científicos, onde demonstravam redução de patógenos alimentares em produtos de frutos do mar.

Em relação as preparações à base de ovos (*eggnog* e *tiramisù*), a utilização de rum como bebida alcoólica não proporcionou reduções significativas em ambas as preparações. Por outro lado, a aplicação de calor teve um papel primordial em ambas as preparações. A aplicação de um tratamento térmico elevado (dois aquecimentos sequenciais, de 80° e 70°C, respectivamente) na preparação *eggnog* não promoveu a eliminação completa de *Salmonella*, mas permitiu significativa redução de 5,40 log UFC/g em suas contagens. O mesmo pode-se expor para sobremesa *tiramisù*, quando faz-se o uso da alternativa mais utilizada atualmente para promover a segurança da preparação, que seria o aquecimento da calda de açúcar sobre as gemas cruas. Quando a calda é aquecida a 90°C, embora há redução em níveis consideráveis (6,32 log UFC/g) do patógeno, não há a eliminação completa de *Salmonella*. Contudo, quando a mesma calda foi aquecida a 121°C, foi capaz de observar a redução completa de *Salmonella*, promovendo sua total eliminação. Entretanto, apesar deste método ter sido eficaz contra *Salmonella*, ele propagou alterações visíveis na gema de ovo, possivelmente desencadeando uma alteração sensorial na sobremesa, tendo a possibilidade de não serem bem aceita por *chefs*.

Em relação ao ceviche, todos os tempos de marinação do prato, bem como a aplicação de tratamentos alternativos, tiveram reduções de *L. monocytogenes*. A pesquisa revelou que a marinação do ceviche, juntamente com a adição de suco de limão, desempenha um papel significativo na redução das contagens de *L. monocytogenes* em um curto período de tempo (<30 minutos). À medida que a marinação se prolonga, observamos maiores reduções nas contagens do patógeno, embora também ocorram alterações visíveis na aparência e textura do peixe. Por outro lado, ao aplicar o tratamento térmico (SV) em conjunto com o suco de limão, obtemos reduções semelhantes nas contagens de *L. monocytogenes*, porém com impactos mais substanciais na aparência do prato devido ao cozimento. No entanto, é importante destacar que essas reduções são significativas, embora haja uma clara modificação na preparação do ceviche. Portanto, a viabilidade dessas alterações precisa ser discutida com chefs, considerando o equilíbrio entre a segurança e a preservação das características tradicionais do prato.

O capítulo sobre a segurança de pescados, destacou que os principais perigos biológicos relacionados aos peixes são as bactérias patogênicas, que exigem cuidados na aquisição, manipulação e preparação dos pescados. Durante a compra, é importante escolher peixes que passaram por inspeção sanitária, verificando a presença de selo de inspeção e a integridade visual e sensorial (frescor, superfície do corpo limpa, olhos transparentes, brilhantes e salientes; com odor natural, próprio e suave e característico). O armazenamento, transporte e distribuição adequado também é importante para evitar a multiplicação de patógenos alimentares nos peixes. Preparações que geralmente envolvem pescados crus ou mal-cozidos requerem cuidados maiores. Para garantir uma preparação segura, recomenda-se realizar uma validação, em laboratórios especializados, onde a sobrevivência de patógenos inoculados é acompanhada para verificar a eficácia do processo. Independente da preparação, a utilização de matérias-primas inspecionadas é essencial, bem como a aplicação e manutenção das boas práticas durante todo a cadeia de processo.

Das três preparações avaliadas em laboratório, de acordo com suas receitas clássicas, nenhuma pôde ser considerada segura quando utilizado produtos à

base de ovos e peixes altamente contaminados. Para promover a segurança do *eggnog*, é necessário adquirir ovos provenientes de granjas e indústrias fiscalizadas por órgãos reguladores, prepará-lo com alto tratamento térmico (aquecer o leite até 80°C e depois retornar com a mistura ao fogo até atingir 70°C) e consumi-lo imediatamente. Na preparação do *tiramisù*, a alteração testada através do aquecimento com calda doce (açúcar, xarope e água) até 121°C e vertido sobre as gemas, foi capaz de inativar a *Salmonella*. Porém, é necessário discutir essa alteração com *chefs*, em relação ao aspecto sensorial final da sobremesa, uma vez que a textura da gema visivelmente foi alterada. Outra alternativa aconselhada por *chefs*, foi aquecer a mesma calda de açúcar em até 90°C, temperatura onde não ocorre a caramelização da calda e nem o superaquecimento das gemas, e verter sobre elas. Embora essa redução tenha reduzido significativamente, não houve uma inativação das contagens de *Salmonella* na gema de ovo, não sendo possível aconselhar como um método seguro para utilização. Para reduzir o risco da preparação de ceviche é aconselhável adquirir a tilápia de locais com procedência, ou seja, que comercializam frutos do mar de indústrias inspecionadas por órgãos reguladores, bem como, higienizar todos os ingredientes frescos da preparação adequadamente e manter a preparação em marinação por pelo menos 1h, sob refrigeração (<4°C), onde foi possível identificar uma redução maior que 1 log CFU/g de LM. Além disso, condições adequadas de BP sejam adotadas, durante todo o processo de elaboração da receita. Os resultados deste estudo podem ser utilizados por serviços de alimentação que trabalham com gastronomia, bem como pela população no geral que desejam prepará-las em suas residências, a fim de promover modos seguros de preparação de receitas à base de ovos e peixes.

## 10. REFERÊNCIAS

ABSOLUT DRINKS. **Egg-nog Receita | Absolut Drinks**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.absolutdrinks.com/pt/drinks/egg-nog/>. Acesso em: 13 jul. 2020.

ADZITEY, F.; HUDA, N. *Listeria monocytogenes* in foods: Incidences and possible control measures. **African Journal of Microbiology Research**, [s. l.], v. 4, n. 25, p. 2848–2855, 2010.

AGUILERA, J. M. **Edible Structures: The Basic Science of What We Eat - 1st Edition - Jo**. [S. l.: s. n.], 2013.

AUVOLAT, A.; BESSE, N. G. **The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food**. [S. l.]: Academic Press, 2016.

BARANCELLI, G. V.; MARTIN, J. G. P.; PORTO, E. *Salmonella* em ovos: relação entre produção e consumo seguro. **Segurança Alimentar e Nutricional**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 73, 2015.

BARHAM, P. *et al.* Molecular gastronomy: A new emerging scientific discipline. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 110, n. 4, p. 2313–2365, 2010.

BRADEN, C. R. *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis and Eggs: A National Epidemic in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 512–517, 2006.

BRASIL. **Resolução RDC nº 216, de 15 de Setembro de 2004**. Brasil: Agência Nacional da Vigilância Sanitária, 2004. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0216\\_15\\_09\\_2004.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0216_15_09_2004.html). Acesso em: 30 jul. 2023.

BRASIL. **Surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2022**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2022>. Acesso em: 30 jul. 2023.

CARLIN, C. R. *et al.* *Listeria cossartiae* sp. Nov., *listeria immobilis* sp. nov., *listeria portnoyi* sp. nov. and *listeria rustica* sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 71, n. 5, p. 004795, 2021. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004795>. Acesso em: 23 out. 2023.

CASARIN, L. S. *et al.* Influence of free energy on the attachment of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on stainless steels AISI 304 and AISI 316. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 69, n. 69, p. 131–138, 2016.

CDC. How Restaurants Prepare Eggs EHS-Net Study Findings and Recommendations What the Study Described. [s. l.], 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/>. Acesso em: 25 dez. 2021.

CDC. **Outbreak Details : Foodborne Illness Outbreak Database**. [S. l.], 2008. Disponível em: <http://www.outbreakdatabase.com/details/massachusetts-private-home-egg-nog-2008/>? Acesso em: 16 jul. 2020.

CDC. Preliminary Incidence and Trends of Infections Caused by Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2016–2021. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, [s. l.], v. 71, n. 40, p. 1260–1264, 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/71/wr/mm7140a2.htm>. Acesso em: 29 set. 2023.

CDC. **Suggested Citation: CDC. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012**. [S. l.: s. n.], 2014.

CLARK, M. Foodborne Illness Outbreak Database. [s. l.], 2008.

CODEX ALIMENTARIUS. **GENERAL PRINCIPLES OF FOOD HYGIENE**. [S. l.: s. n.], 2011.

COELHO, R. C. **Os Franceses**. 1.ed.ed. São Paulo: Contexto, 2008.

CÔNSOLI, M. A. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO MATHEUS ALBERTO CÔNSOLI **Análise dos Aspectos Relevantes para Integração na Cadeia de Suprimentos Aplicada ao Setor de Serviços de Alimentação**. 2009. - Universidade de São Paulo, [s. l.], 2009.

CRAFTY BAKING. **Eggs - Cooking Techniques for Safe Soft Meringue | CraftyBaking | Formerly Baking911**. [S. l.], 2010. Disponível em: <https://www.craftybaking.com/howto/eggs-cooking-techniques-safe-soft-meringue>. Acesso em: 7 jan. 2023.

CRUZ, C. D. *et al.* Epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 375–383, 2008.

DA CUNHA, D. T.; STEDEFELDT, E.; DE ROSSO, V. V. The role of theoretical food safety training on Brazilian food handlers' knowledge, attitude and practice. **Food Control**, [s. l.], v. 43, p. 167–174, 2014.

DILLON, R. M.; PATEL, T. R. **Copyright©, International Association of Milk Journal of Food Protection**. [S. l.: s. n.], 1992.

EFSA. Imported from <https://www.efsa.europa.eu/it/news/mammalnet-live-download-simple-app-and-help-us-collect-data-wild-mammals-europe>. **EFSA Journal**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 726, 2008.

EFSA. **Salmonella story map**. [S. l.: s. n.], 2022.

ELBEHIRY, A. *et al.* **Application of MALDI-TOF MS fingerprinting as a quick tool for identification and clustering of foodborne pathogens isolated from food products***New Microbiologica*. [S. l.: s. n.], 2017.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. **Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen**. [S. l.]: American Society for Microbiology (ASM), 1991.

FUCHS, R. S.; SIRVAS, S. Incidence of *Listeria monocytogenes* in an acidified fish product, ceviche. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 88–

90, 1991. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.1991.tb00512.x>. Acesso em: 30 jun. 2020.

GALIŞ, A. M. *et al.* Control of *Salmonella* Contamination of Shell Eggs-Preharvest and Postharvest Methods: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 155–182, 2013.

GANDHI, V. P.; ZHOU, Z. Food demand and the food security challenge with rapid economic growth in the emerging economies of India and China. **Food Research International**, [s. l.], v. 63, p. 108–124, 2014.

HALL, V. *et al.* Notes from the Field: *Vibrio cholerae* Serogroup O1, Serotype Inaba — Minnesota, August 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, [s. l.], v. 66, n. 36, p. 961–962, 2017.

HITCHINS, A. D.; WHITING, R. C. Food-borne *Listeria monocytogenes* risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 1108–1117, 2001.

HOFFMANN, S.; MACULLOCH, B.; BATZ, M. Economic burden of major foodborne illnesses acquired in the United States. **Economic Cost of Foodborne Illnesses in the United States**, [s. l.], n. 140, p. 1–74, 2015.

HOWARD, Z. R. *et al.* *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. **Food Research International**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 755–764, 2012.

HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 504–509, 2004.

HUMPHRIES, C. Cooking: Delicious science. **Nature**, [s. l.], v. 486, n. 7403 SUPPL., p. S10–S11, 2012.

JAY, J. **Microbiologia de Alimentos**. 6ªed. Porto Alegre: [s. n.], 2005.

JOFRÉ, A. *et al.* Closing gaps for performing a risk assessment on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: activity 1, an extensive literature

search and study selection with data extraction on *L. monocytogenes* in a wide range of RTE food. **EFSA Supporting Publications**, [s. l.], v. 13, n. 12, 2016.

KARIM, P.; EMBAREK, B. **Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review** *International Journal of Food Microbiology*. [S. l.: s. n.], 1994.

KATZ, S. E. **A Arte da Fermentação**. [S. l.: s. n.], 2014.

KO, W. H. The relationship among food safety knowledge, attitudes and self-reported HACCP practices in restaurant employees. **Food Control**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 192–197, 2013.

LAVONNE MEYER. **Egg Safety with Holiday Foods**. [S. l.], 2018. Disponível em: <https://extension.sdstate.edu/egg-safety-holiday-foods>. Acesso em: 6 jan. 2023.

LE CORDON BLEU. **Oficina “Tiramisu” | Le Cordon Bleu Dusit**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.cordonbleu.edu/thailand/tiramisu/en>. Acesso em: 14 jul. 2020.

LIU, H. *et al.* Household composition, income, and food-away-from-home expenditure in urban China. **Food Policy**, [s. l.], v. 51, p. 97–103, 2015.

LOPES, S. M.; BATISTA, A. C. F.; TONDO, E. C. Salmonella survival during soft-cooked eggs processing by temperature-controlled water circulator. **Food Control**, [s. l.], 2018.

LOPES, S. M.; DA SILVA, D. C.; TONDO, E. C. **Bactericidal effect of marinades on meats against different pathogens: a review**. [S. l.]: Taylor and Francis Ltd., 2022.

LOPES, S. M.; TONDO, E. C. Survival of Salmonella in Peruvian pisco sour drink. **LWT**, [s. l.], v. 117, p. 108608, 2020. Disponível em: Acesso em: 28 jun. 2020.

MAJOWICZ, S. E. *et al.* The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 50, n. 6, p. 882–889,



2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20158401/>. Acesso em: 15 jul. 2020.

MATHUR, P.; SCHAFFNER, D. Effect of Lime Juice on *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella enterica* Inactivation during the Preparation of the Raw Fish Dish Ceviche. **Journal of Food Protection**, [s. l.], 2013. Disponível em: [http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/76/6/1027/1687212/0362-028x\\_jfp-12-526.pdf](http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/76/6/1027/1687212/0362-028x_jfp-12-526.pdf). Acesso em: 30 jun. 2020.

O'DEA, D.; HEWSON, Dr. K. **The Culinary Uses of Eggs**. [S. l.: s. n.], 2015.

PASTERNAK, J. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 118–119, 2012.

RAMASWAMY, V. *et al.* *Listeria*--review of epidemiology and pathogenesis. **undefined**, [s. l.], 2007.

SCALLAN, E. *et al.* Foodborne illness acquired in the United States--Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.

SEBRAE. **Alimentação fora do lar**. [S. l.: s. n.], 2019.

SILVA, L. P. A. *et al.* Benefícios da Utilização do Software de Gestão de Estoque no Setor de Alimentação Fora do Lar. [s. l.], 2019.

SILVA, S. M. C. S.; BERNARDES, S. M. **Cardápio guia prático para a elaboração**. 1a . Edição. São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2001.

SLEATOR, R. D. *et al.* **The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract**. [S. l.: s. n.], 2009.

SOUZA, J. M. L. de *et al.* **Peixe Defumado**. [S. l.: s. n.], 2007.

SUNDQVIST, J. Gastronomic experiences: Motives, activities, and teleology. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, [s. l.], v. 31, 2023. Disponível em: Acesso em: 24 out. 2023.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. **The epidemiology of human listeriosis**. [S. l.: s. n.], 2007.

THATHSARANI, A. P. K.; ALAHAKOON, A. U.; LIYANAGE, R. Current status and future trends of sous vide processing in meat industry; A review. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 129, p. 353–363, 2022. Disponível em: Acesso em: 24 out. 2023.

THE SPRUCE EATS. **History and Origins of Egnog**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.thespruceeats.com/origins-of-eggnog-760173>. Acesso em: 3 out. 2023.

TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. 2ª edição. Porto Alegre: [s. n.], 2019.

TORRES-VITELA, M. R. *et al.* **Survival of Vibrio cholerae O1 in Ceviche and Its Reduction by Heat Pretreatment of Raw Ingredients***Journal of Food Protection*. [S. l.: s. n.], 2000. Disponível em: [http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/63/4/445/2204370/0362-028x-63\\_4\\_445.pdf](http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/63/4/445/2204370/0362-028x-63_4_445.pdf). Acesso em: 30 jun. 2020.

USDA-ERS. - **Food Away from Home**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/topics/food-choices-health/food-consumption-demand/food-away-from-home.aspx>. Acesso em: 26 dez. 2019.

USDA-ERS. **Cost Estimates of Foodborne Illnesses**. [S. l.], 2018. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illnesses.aspx>. Acesso em: 15 jul. 2020.

VEGA, C.; MERCADÉ-PRIETO, R. Culinary Biophysics: On the Nature of the 6X°C Egg. **Food Biophysics**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 152–159, 2011.

WHILEY, H.; GARDNER, M. G.; ROSS, K. A Review of Salmonella and Squamates (Lizards, Snakes and Amphisbians): Implications for Public Health. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 6, n. 3, 2017.

WHO. **Five Keys to Safer Food Manual**. France: [s. n.], 2006.

WHO. Food safety. **World Health Organization**, Genebra, 2015.

WU, S. L. Factors influencing the implementation of food safety control systems in Taiwanese international tourist hotels. **Food Control**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 265–272, 2012.

ZANONI, C. R. **O mercado de gastronomia de São Paulo: Maximização de valor na gastronomia: O caso de restaurantes de alto padrão em São Paulo**. 2012. - FUNDAÇÃO GETÚLIO VARGAS , São Paulo, 2012.

ZHANG, M. *et al.* Effect of sous vide cooking treatment on the quality, structural properties and flavor profile of duck meat. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, [s. l.], v. 29, p. 100565, 2022. Disponível em: Acesso em: 24 out. 2023.

ZHANG, X. *et al.* Review controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat and poultry products: An overview of outbreaks, current legislations, challenges, and future prospects. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 116, p. 24–35, 2021. Disponível em: Acesso em: 29 set. 2023.