



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL



INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ELIS REGINA GOMES ALFAMA

IDENTIFICAÇÃO DE CENÁRIOS DE TEMPERATURAS DE DISTRIBUIÇÃO EM
RESTAURANTES INDUSTRIAIS NO BRASIL E MODELAGEM DA MULTIPLICAÇÃO
DE PATÓGENOS ALIMENTARES EM PREPARAÇÕES DE RISCO

Porto Alegre

2018

ELIS REGINA GOMES ALFAMA

IDENTIFICAÇÃO DE CENÁRIOS DE TEMPERATURAS DE DISTRIBUIÇÃO EM
RESTAURANTES INDUSTRIAIS NO BRASIL E MODELAGEM DA MULTIPLICAÇÃO
DE PATÓGENOS ALIMENTARES EM PREPARAÇÕES DE RISCO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (Área de Concentração Ciência e Tecnologia de alimentos) como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Gomes Alfama, Elis Regina
IDENTIFICAÇÃO DE CENÁRIOS DE TEMPERATURAS DE
DISTRIBUIÇÃO EM RESTAURANTES INDUSTRIAIS NO BRASIL E
MODELAGEM DA MULTIPLICAÇÃO DE PATÓGENOS ALIMENTARES EM
PREPARAÇÕES DE RISCO / Elis Regina Gomes Alfama. --
2018.
134 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, 2018.

1. Temperaturas de distribuição. 2. Microbiologia
preditiva. 3. Patógenos bacterianos. 4. Surtos. I.
Tondo, Eduardo Cesar, orient. II. Título.

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

ELIS REGINA GOMES ALFAMA

TESE

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

DOUTOR EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:

Homologada em:

Pela Banca Examinadora:

Por:

EDUARDO CESAR TONDO

Orientador – PPGCTA/UFRGS

ADRIANO BRANDELLI

Coordenador – Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos –
PPGCTA/UFRGS

SIMONE HICKMANN FLÔRES

Banca – PPGCTA/UFRGS

ANA BEATRIZ ALMEIDA DE OLIVEIRA

Banca- Nutrição/UFRGS

Dedico este trabalho aos meus pais, Ignácio (in memoriam) e Maria Celi que sempre me apoiaram, me ensinaram a correr atrás dos meus sonhos e acima de tudo, ter amor ao próximo. Obrigado por todo o ensinamento.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Dr. Eduardo Cesar Tondo pela acolhida no laboratório em 2012, quando me recebeu como estagiária voluntária. Muito obrigada por todos esses anos de aprendizado no mestrado e no doutorado e por me incentivar a seguir em frente e conquistar meu espaço como professora. Obrigada pela oportunidade, confiança e pela contribuição na minha formação e crescimento profissional, serei sempre grata!

À minha querida família, meu pai Ignácio (*in memoriam*) minha mãe Maria Celi sempre do meu lado em todos os momentos, aos meus filhos Vinícius e Germano pelo amor, carinho e compreensão pela minha ausência, mas principalmente por estarem sempre me apoiando nesta caminhada, sem vocês ao meu lado isso não seria possível.

Agradecimento especial a minha amiga Claudia Titze Hessel pela parceira incansável nesses últimos dois anos. Primeiro me ajudando a desvendar a estatística em horas de trabalho e de muitas e muitas tabelas. Depois, incansavelmente parceira de muitos momentos, com suas ideias, onde aprendemos juntas a desvendar outros programas (software) que iriam contribuir para o resultado final desse trabalho. Meu muito obrigada de coração por toda a tua ajuda, incentivo e amizade. Esse apoio foi fundamental para a realização desse trabalho.

À minha amiga Mariângela Terra Santiago, a querida Mana, presente que a UFRGS me deu, que ao longo desses anos de mestrado e doutorado esteve presente me ajudando em todos os momentos e nas longas viagens, que muito aprendemos e demos boas risadas.

À minha amiga Valquíria Batista que recentemente se juntou a mim na realização desse trabalho e pelas longas noites no laboratório.

Ao meu querido amigo Carlos Pagno pelo apoio, ajuda, parceria e incentivo.

À Susana Elias pela ajuda na reta final e aos demais colegas do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS), pela convivência e amizade.

Às minhas queridas alunas e amigas que a PUCRS me presenteou, em especial a Janaína Martinez, Tatiana Gibeke, Marcela Cancino, Tainá Rodrigues, Elana Wagner, Roberta Cunha e Linara Mello que ao longo desses anos muito me apoiaram e me incentivaram nessa conquista.

Aos meus amigos queridos, em especial a Adriana Gerhardt, pelo apoio em momentos difíceis, pelas conversas, pelas alegrias e risadas e pela parceria de todos esses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pelo suporte financeiro, tornando possível a realização deste trabalho.

As professoras da banca avaliadora por terem aceito o convite.

Enfim, meu muito obrigado a todos que de certa forma dividiram comigo este momento.

“Um mestre na arte de viver não faz qualquer distinção nítida entre seu trabalho e sua obra; seu trabalho e seu lazer; sua mente e seu corpo; sua educação e sua recreação. Ele mal sabe qual é qual. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência através de tudo o que ele está fazendo e deixa os outros para determinar se ele está trabalhando ou se divertindo. Para si mesmo, ele sempre parece estar fazendo os dois!”

Lawrence Pearsall Jacks

RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar cenários de temperaturas de distribuição de preparações servidas em restaurantes industriais no Brasil e modelar a multiplicação de patógenos alimentares em preparações de risco. Para tanto, foram investigados os registros de temperaturas de distribuição de alimentos quentes e frios de 377 restaurantes industriais distribuídos nas cinco macrorregiões do Brasil. Foram compilados os registros referentes a um mês do verão (março) e um mês do inverno (julho), no intuito de investigar possíveis influências externas nas temperaturas de distribuição. As temperaturas dos registros foram comparadas com as temperaturas externas divulgadas pelo INMET, das macrorregiões onde os restaurantes estavam localizados. Dois patógenos alimentares foram escolhidos e suas respectivas multiplicações foram simuladas nos cenários de temperatura identificados nas preparações frias, uma vez que mais de 99,5% das preparações quentes estavam em temperaturas consideradas seguras. A multiplicação de *Salmonella* spp. foi simulada em temperaturas de 7 a 40°C, enquanto que a multiplicação de *Listeria monocytogenes* foi simulada em temperaturas de 1 a 40°C, durante um período de seis horas. Posteriormente, foi definido o potencial de multiplicação (δ) de cada patógeno, permitindo definir a diferença entre a população final e sua população inicial, em determinados alimentos. Com base na análise de 339.548 registros, foram identificadas as sete principais preparações frias distribuídas nos restaurantes, somando 16.754 dados de temperaturas que variaram entre 1 e 38,3°C. Destas preparações, apenas 11% estavam em temperaturas menores que 5°C, o que demonstrou a dificuldade em manter os alimentos refrigerados em temperaturas preconizadas pela legislação brasileira, durante a distribuição. Foram identificadas 15 principais preparações quentes distribuídas, totalizando 34.060 dados analisados, com temperaturas médias de 78,3°C. Este resultado foi considerado adequado, pois 99,5% das preparações quentes selecionadas estavam acima de 60°C, como preconizado pela legislação brasileira. Alimentos quentes preparados com molho, apresentaram em média 4,6°C acima dos alimentos sem molho. Este fato pode ser explicado pela melhor condutividade térmica de alimentos com maior teor líquido e/ou preparados em água. A temperatura média dos alimentos em março (verão) foi superior à temperatura média em julho (inverno) na macrorregião Sudeste, seguindo o comportamento semelhante da temperatura externa, que em março foi 4,9°C maior, comparada com o mês de julho, na mesma macrorregião. Esse resultado sugere que temperaturas externas podem influenciar as temperaturas de distribuição das preparações frias nos restaurantes industriais. As outras macrorregiões não apresentaram diferença significativa nas temperaturas dos alimentos na distribuição, quando comparados com a temperaturas externas dos meses de março e julho. A distribuição Beta General demonstrou melhor ajuste de dados para descrever os cenários de temperaturas de distribuição das preparações frias, enquanto a distribuição Triangular apresentou melhor ajuste para as refeições quentes. Os modelos preditivos simulados no Combase para avaliar a taxa de multiplicação, no tempo máximo de exposição de seis horas, de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em alimentos frios não apresentaram taxa de multiplicação significativa (0 - 0,43 log UFC/g) entre 7 e 21°C para *Salmonella* spp. e para *L. monocytogenes*, entre 1 e 21°C (0 e 0,19 log UFC/g). Para ambos os patógenos, a taxa de multiplicação foi considerada insignificante. No entanto, no cenário real (temperaturas de distribuição entre 1 e 38,3°C, deste estudo) *Salmonella* spp. pode se multiplicar 1,06 log UFC/g e *L. monocytogenes* 2,09 log UFC/g, após 6h. Considerando que *Salmonella* spp. tem uma multiplicação ótima entre 35 e 37°C, e que *L. monocytogenes* pode multiplicar-se em temperaturas de refrigeração, as temperaturas de distribuição devem ser controladas. Na temperatura de 10°C, a multiplicação foi insignificante para ambas as bactérias, segundo o ComBase, demonstrando ser uma temperatura capaz de controlar a multiplicação desses patógenos na distribuição de alimentos por seis horas. Após a identificação desses cenários, foram selecionadas três preparações frias que apresentaram temperaturas não-conformes na distribuição, sendo dois alimentos que sofreram tratamento térmico (beterraba e

cenoura cozidas), ambos com temperaturas de distribuição entre 1 e 37°C e um alimento *in natura* (repolho cru), o qual foi distribuído em temperaturas entre 1 e 38,3°C. Esses alimentos foram contaminados artificialmente com um *pool* de *Salmonella* e submetidos a temperaturas de 7, 10, 20, 30 e 38°C, a fim de construir curvas de multiplicação isotérmicas. Esses resultados foram ajustados aos modelos do programa de microbiologia preditiva ComBase, através dos modelos preditivos primários e secundários. Em beterraba cozida, a fase lag foi de 117 e 30h quando o alimento foi exposto a temperaturas de 7 e 10°C, sendo que a taxa de multiplicação foi inferior a 1 log UFC/g/h. A 20, 30 e 38°C, a fase lag foi de 5, 2 e 1h, respectivamente. Para cenoura cozida, a fase lag foi de 440 e 28h quando exposta a temperaturas de 7 e 10°C, respectivamente, enquanto que a 20, 30 e 38°C a fase lag foi de 4, 3 e 1h, respectivamente. No repolho cru não houve multiplicação nas temperaturas de 7 e 10°C em 29 dias e 14 dias, no entanto a 30°C, a fase lag foi de 8h. A 20 e 38°C a fase lag foi de 5 e 3h, respectivamente. O modelo secundário confirmou um bom ajuste entre os dados experimentais e os preditos no ComBase com coeficiente de determinação R^2 e RMSE para beterraba cozida (0,97; 0,005, respectivamente), cenoura cozida (0,98; 0,003, respectivamente) e repolho cru (0,92; 0,036, respectivamente). Os resultados demonstraram que em temperaturas abaixo de 10°C, a menor fase lag encontrada nos alimentos analisados foi de 28h. Este tempo de fase lag encontrado é bem superior as 6h que os alimentos podem ficar expostos na distribuição, segundo a legislação brasileira. Este resultado sugere que beterrabas e cenouras cozidas, assim como repolhos crus ficariam seguros se expostos a temperatura de 10°C e com tempo de distribuição de seis horas ou mais. Além disso, foram analisados 23 picadores de legumes “tipo aranha” de 23 cozinhas industriais que produziam em média 1.110 kg por dia de beterraba cozida e utilizavam os picadores para os cortes. Foi avaliada a contaminação microbiológica dos picadores, haja visto que este equipamento já foi indicado como fonte de contaminação de beterrabas cozidas. O *software* @Risk foi utilizado para simular a prevalência de distribuição de *Salmonella* spp. em beterraba cozida e análises microbiológicas foram utilizadas para avaliar a multiplicação de mesófilos totais, *Enterobacteriaceae* e *Salmonella* spp. nas beterrabas contaminadas pelos picadores. Os resultados demonstraram que as contagens de mesófilos totais variaram de ND (não detectados) a $> 10^4$ UFC/cm² e para *Enterobacteriaceae* variaram de ND a 4,06 log UFC/cm², com média de 1,06 log UFC/cm² sobre as lâminas dos picadores. Em nove picadores não foi encontrada a presença de *Enterobacteriaceae*, no entanto, dois picadores demonstraram a presença de *Salmonella* spp. Simulações no @Risk apresentaram a prevalência de distribuição de *Salmonella* spp. em beterraba cozida em média de 144 kg/dia, considerando a média total produzida pelos 23 restaurantes, sendo que essa contaminação poderia chegar em até 25% do total produzido. Esse resultado é preocupante, já que a legislação preconiza ausência de *Salmonella* spp. em alimentos prontos para consumo e esse micro-organismo é o principal patógeno alimentar brasileiro. Por fim, os resultados desse estudo demonstraram que os patógenos não se multiplicaram em temperaturas de 10°C, sugerindo essa temperatura como segura para os alimentos em exposição e, além disso, o tempo longo de fase lag, 28 horas, nessa temperatura, não apresentou multiplicação significativa, indicando a possibilidade do tempo de exposição ser maior que 6 horas. Os parâmetros obtidos neste estudo, podem contribuir para subsidiar decisões dos gestores dos serviços de alimentação na segurança e na qualidade dos alimentos oferecidos, a fim de prevenir Doenças Transmitidas por Alimentos.

Palavras-chave: Microbiologia preditiva; contaminação; vegetais; patógenos bacterianos; surtos.

ABSTRACT

The aim of these project was to identify different temperature scenarios from Corporate Catering Food Services of Brazil and model the growth of foodborne pathogens in risky preparations. For this, from 377 restaurants distributes in the five macro regions of Brazil records of the most consumed preparations and its distribution temperature were investigated. Records were compiled for a summer month (March) and a winter month (July), to investigate the influence of external temperature on the meal distribution temperature. The temperature data obtained from the records were compared with the external averages temperature reported by INMET, from the macro-regions where the results were located. Two pathogens were selected for the predictive growth assay. For this the scenario of cold distribution were chose, since the 99.5% of the hot preparations were under safe distribution temperature. *Salmonella* spp. Growth was simulated at temperatures of 7 to 40 °C, while the multiplication of *Listeria monocytogenes* was simulated at temperatures of 1 to 40 °C for six hours. Subsequently, the potential of multiplication (δ) of each pathogen was defined, allowing to state the difference between the final population and its initial population in the meals studied. Based on the analysis of 339.548 records, it was identified the 7 most consumed cold preparations. 16.754 temperatures data from cold preparations were compiled, ranging between 1 and 38.3 °C. Only 11% of these preparations were at temperatures lower than 5 °C, which demonstrate the difficulty faced by these restaurants to keep foods refrigerated under the conditions predefined by Brazilian legislation. It was identified the 15 most consumed hot preparations, totaling 34.060 analyzes data showing average of 78.3 °C of meals distribution temperature. This temperature was considered adequate, since 99.5% of the hot preparations selected were above 60 °C, as recommended by Brazilian legislation. Hot foods prepared with sauce, presented on average 4.6 °C above foods prepared without sauce. This fact can be explained by the better thermal conductivity of foods with higher liquid content and/or prepared in water. The average temperature of foods distributed in March (summer) was higher than the average temperature in July (winter) in the Southeast macro-region, following the similar behavior of the external temperature - in March external temperature was 4.9 °C higher than compared to July. This result suggests that external temperatures may influence the cold season distribution temperatures in industrial restaurants. In other macroregions there were not significant difference in food temperatures between March and July. Beta General distribution demonstrated the best fit of data of distribution temperatures of cold preparations and Triangular distribution for the hot meals. The predictive models simulated in Combase to evaluate the multiplication rate, maximum exposure time of six hours, for *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in cold foods did not present significant multiplication rate (0 - 0.43 log CFU/g) between 7 and 21 °C for *Salmonella* spp. and between 1 and 21 °C for *L. monocytogenes*, (0 and 0.19 log CFU/g). For both pathogens, the multiplication rate was considered insignificant. However, in the real scenario (distribution temperatures between 1 and 38.3 °C – data from this study) *Salmonella* spp. growth 1.06 log CFU/g and *L. monocytogenes* growth 2.09 log CFU/g after 6h. Considering that *Salmonella* spp. has an optimal multiplication between 35 and 37 °C, and that *L. monocytogenes* can multiply in cooling temperatures, distribution temperatures must be controlled. At the temperature of 10 °C, multiplication was insignificant for both bacteria, according to ComBase, showing that this temperature as capable to control the multiplication of these pathogens in the food distribution for six hours. After the identification of these scenarios, three cold preparations distributed under nonconforming temperatures were selected for predictive assay: two foods submitted to thermal treatment (beet and carrot cooked - both with distribution temperatures between 1 and 37 °C) and one served *in natura* (raw cabbage - distributed at temperatures between 1 and 38.3 °C). These foods were artificially contaminated with a *Salmonella* pool and submitted to temperatures of 7, 10, 20, 30 and 38 °C in order to build their isothermal multiplication curves.

These results were adjusted to the predictive models of the ComBase program, through the primary and secondary predictive models. In cooked beets, the lag phase was 117 and 30h when the food was exposed to temperatures of 7 and 10 °C, respectively, and the multiplication rate was less than 1 log CFU/g/h. At 20, 30 and 38 °C, the lag phase was 5, 2 and 1h, respectively. For cooked carrots, the lag phase was 440 and 28h when exposed to temperatures of 7 and 10 °C, respectively, while at 20, 30 and 38 °C the lag phase was 4, 3 and 1h, respectively. In the raw cabbage there was no multiplication at temperatures of 7 and 10 °C in 29 days and 14 days, however at 30 °C, the lag phase was 8h. At 20 and 38 °C the lag phase was 5 and 3h, respectively. The secondary model confirmed a good fit between the experimental data and those predicted in ComBase with determination coefficient R^2 and RMSE for cooked beets (0.97; 0.005, respectively), cooked carrots (0.98; 0.003, respectively), and raw cabbage (0.92; 0.036, respectively). The results showed that at temperatures below 10 °C the lowest lag phase found in the analyzed foods was 28h. The lag phase found time is above 6 h, the time that food can be distributed according to Brazilian legislation. This result suggests that cooked beets, carrots and raw cabbages would be safe if exposed to a temperature of 10 °C and distributed for six hours or more. In addition, 23 vegetable choppers (spider-type) were analyzed from 23 industrial kitchens that produced an average of 1.110 kg per day of cooked beet and used the choppers for their cuts. The microbiological contamination of the choppers was evaluated, since this equipment was already indicated as a source of contamination in cooked beets. The @Risk software was used to estimate the distribution of *Salmonella* spp. in cooked beets and microbiological analyzes were used to evaluate a multiplication of total mesophiles, *Enterobacteriaceae* and *Salmonella* spp. in the cooked beets contaminated by the choppers. The results showed mesophiles ranging from ND (undetected) to $> 10^4$ CFU/cm² and *Enterobacteriaceae* ranging from ND to 4.06 log CFU/cm², with a mean of 1.06 log CFU/cm² over blades of choppers. In nine choppers *Enterobacteriaceae* were not found, however, in two there were presence of *Salmonella* spp. Simulations on @Risk showed that *Salmonella* spp. prevalence distribution in cooked beets average is 144 kg/day, considering the total production from the 23 restaurants, and this contamination reached up to 25% of the total produced. This result is worrying, since legislation prescribes absence of *Salmonella* spp. in ready-to-eat foods and this microorganism is the main foodborne pathogen Brazilian. Thus, the results of this study demonstrated that the pathogens did not multiplied in temperatures of 10 °C, suggesting this temperature as safe for the foods on distribution. In addition, the long lag phase of 28 hours showed at this temperature in the predictive assay, indicates that the exposure time may be longer than 6 hours. The parameters obtained in this study can help food service managers in the safety and quality decision in order to prevent Foodborne Diseases.

Keywords: Predictive microbiology; contamination; vegetables; foodborne pathogen; outbreaks.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Número de refeições/dia (em milhões) produzido pelas prestadoras de serviço de refeições coletivas e refeições de convênio no período de 2010 a 2018.....	17
TABELA 2 - Demonstrativo do faturamento (em bilhões de reais) aproximado de refeições coletivas e refeições convênio período de 2010 a 2018.....	18
TABELA 3 - Critérios de tempo x temperatura referente aos alimentos expostos para o consumo imediato, segundo a RDC 216/2004, a CVS 5/2013 e a Portaria 78/2009.....	20
TABELA 4 - pH e atividade de água (aw) das refeições frias avaliadas.....	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO.....	17
3.2 LEGISLAÇÃO APLICADA AO SERVIÇO DE ALIMENTAÇÃO.....	19
3.3 MICROBIOLOGIA PREDITIVA.....	21
3.4 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.....	25
3.5 EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS.....	26
3.6 MICRO-ORGANISMOS DE INTERESSE NA PESQUISA.....	28
3.6.1 <i>Salmonella</i> spp.....	29
3.6.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 COLETA DE DADOS.....	33
4.2 INSERÇÃO DE DADOS NA DISTRIBUIÇÃO.....	34
4.3 CRESCIMENTO PREDITIVO DE PATÓGENOS EM REFEIÇÕES FRIAS.....	35
4.4 CONTAMINAÇÃO NATURAL DOS PICADORES DE VEGETAIS.....	37
4.4.1 Análise microbiológica.....	37
4.5 MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE <i>SALMONELLA</i> EM VEGETAIS.....	39
4.5.1 Beterraba cozida.....	39
4.5.2 Cenoura cozida e repolho cru.....	39
4.5.3 Contaminação artificial de <i>Salmonella</i> em beterraba, cenoura e repolho.....	39
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Artigo 1.....	43
5.2 Artigo 2.....	79
5.3 Artigo 3.....	94
6 DISCUSSÃO GERAL	113
7 CONCLUSÃO	124
8 REFERÊNCIAS	126

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o setor de serviços de alimentação está em expressivo crescimento, principalmente motivado pelo aumento da necessidade de refeições fora de casa, em ambientes de trabalho. Segundo a Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas (ABERC), em 2010, foram oferecidas 9,4 milhões de refeições, enquanto que, em 2018, o número de refeições chegou a 13 milhões, representando um aumento de 38% neste tipo de serviço (ABERC, 2018).

Paralelamente ao desenvolvimento do setor, muitos surtos alimentares têm ocorrido em serviços de alimentação. Por exemplo, no Brasil, dados do Ministério da Saúde, referentes a 2000 até 2017, demonstraram que os serviços de alimentação, como restaurantes/padarias e similares, instituições e ainda as residências, foram os locais onde mais ocorreram surtos alimentares (BRASIL, 2018).

Dentre os diversos monitoramentos necessários nos serviços de alimentação, o controle de tempo e temperatura dos alimentos, provavelmente é um dos mais importantes para evitar surtos alimentares. Entre os tempos e temperaturas a serem controladas, a temperatura dos alimentos na distribuição, provavelmente, é uma das que mais apresenta não-conformidades, uma vez que os equipamentos dificilmente mantêm os alimentos nas temperaturas preconizadas pela legislação brasileira, principalmente os alimentos frios (FRANTZ et al., 2008).

A Legislação Federal Brasileira, assim como a Legislação do Rio Grande do Sul estabelecem que os alimentos quentes devem ser distribuídos a 60°C ou mais, por no máximo seis horas, enquanto que os alimentos que foram resfriados devem ser distribuídos em temperaturas menores que 5°C (BRASIL, 2004; RIO GRANDE DO SUL, 2009). Já a legislação CVS 5/2013, do Estado de São Paulo, permite que os alimentos sejam distribuídos em temperaturas de 10 até 21°C, por até duas horas, ou até quatro horas, abaixo dos 10°C (SÃO PAULO, 2013).

Mesmo com as dificuldades de manterem as temperaturas de distribuição preconizadas pela legislação, dificilmente encontra-se algum relato onde as temperaturas de distribuição foram apontadas como responsáveis pela ocorrência de surtos alimentares, o que levanta dúvidas a respeito dos parâmetros de tempo e temperatura que devem ser respeitados para prevenir Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Além disso, sabe-se que muitos restaurantes industriais apresentam controle e registros das temperaturas de distribuição, o que motivou a análise desses registros e das temperaturas encontradas nos restaurantes industriais, ao invés dos comerciais, os quais nem sempre apresentam esses registros.

Nesse sentido, identificar as temperaturas de distribuição utilizadas nos restaurantes industriais e os alimentos mais oferecidos, poderá colaborar para melhor compreender os possíveis cenários de risco durante a distribuição de alimentos, possibilitando contribuir para a segurança desses alimentos. Outro fator importante a ser considerado são as temperaturas ambientais, principalmente em um país de grandes dimensões como o Brasil. Nosso país apresenta temperaturas externas variadas em suas macrorregiões e essas temperaturas podem influenciar na manutenção de alimentos expostos em diferentes temperaturas.

Dentro deste contexto, obter informações sobre o comportamento e a taxa de multiplicação de patógenos alimentares expostos a cenários de tempo e temperatura encontrados na distribuição de alimentos, adquire grande importância, pois poderá subsidiar conhecimentos que permitirão a prevenção de surtos alimentares.

A microbiologia preditiva possibilita prever a multiplicação de micro-organismos em alimentos, considerando fatores como temperatura, umidade, pH e condições de armazenamento e distribuição. Através dela é possível analisar riscos, melhorar a qualidade e a vida de prateleira dos alimentos e ainda contribuir para tomadas de decisões (OLIVEIRA et al., 2013). Modelos matemáticos têm sido utilizados para simular cinéticas de multiplicação microbiana em diversos alimentos e podem colaborar para melhor compreensão da

multiplicação de patógenos alimentares, como, por exemplo, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em alimentos. *Salmonella* spp. é o principal agente etiológico causador de surtos no Brasil (BRASIL, 2018) e *L. monocytogenes*, apesar de não ter registros de surtos alimentares dentro do país, está envolvida em surtos com alimentos em várias partes do mundo (SCALLAN et al., 2011; STEPHAN et al., 2015; LEONG D., ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. & JORDAN, K., 2014; ONU, 2018). Além disso, ainda é uma bactéria psicrotrófica, capaz de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, como as encontradas durante a distribuição de alimentos.

Assim, o objetivo desse estudo foi identificar cenários de temperaturas de distribuição de preparações servidas em restaurantes industriais no Brasil e modelar a multiplicação de patógenos alimentares em preparações de maior risco, através da modelagem preditiva. Também objetivou-se simular cenários de multiplicação de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em diferentes cenários de temperaturas encontradas na distribuição de alimentos em todo o Brasil. Estes estudos poderão fornecer informações importantes a respeito da realidade de restaurantes industriais, bem como fornecer subsídios para colaborar com a tomada de decisões de gestores, na adoção de procedimentos adequados na distribuição e exposição de alimentos em serviços de alimentação distribuídos em diversas regiões do Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Identificar cenários de temperaturas de distribuição de preparações servidas em restaurantes industriais no Brasil e modelar a multiplicação de patógenos alimentares em preparações de maior risco.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar os cenários de temperaturas de distribuição registradas em planilhas de controle de restaurantes industriais distribuídos no Brasil.
- ✓ Identificar quais as preparações quentes e frias mais produzidas e distribuídas em restaurantes industriais de uma grande empresa presente em diferentes regiões do Brasil.
- ✓ Simular a multiplicação de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em alimentos selecionados e submetidos a diferentes cenários de tempo e temperatura de distribuição.
- ✓ Selecionar os alimentos que foram expostos a temperatura de maior risco e avaliar a multiplicação de *Salmonella* spp. nessas preparações expostas a 7, 10, 20, 30 e 38°C.
- ✓ Determinar os parâmetros cinéticos de multiplicação (tempo de fase lag, taxa de multiplicação e população máxima), em função da temperatura, através de modelos primários e secundários.
- ✓ Avaliar a contaminação microbiológica natural de picadores de legumes.
- ✓ Comparar os modelos de multiplicação obtidos neste estudo com modelos gerados pelo programa *ComBase Predictive Model*.
- ✓ Propor estratégias de medidas de controle de tempo e temperatura na distribuição e reposição de alimentos

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO

O segmento de serviços tem um papel cada vez mais importante na economia mundial, apresentando uma tendência de crescimento observada, principalmente, nas economias em desenvolvimento (ABERC, 2018). No Brasil, o setor de alimentos vem apresentando crescimento expressivo, sendo que a expansão dos serviços de alimentação industrial tem ganhado destaque. Ainda, a alimentação fora do domicílio também está relacionada as mudanças profissionais, aos hábitos culturais e aos fatores econômicos (LIU et al., 2015; BEZERRA et al., 2015).

Os serviços de alimentação para a coletividade fornecem refeições para uma clientela definida, como indústrias, hospitais, escolas, órgãos públicos e privados (PROENÇA, 1996). Dados divulgados pela Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas demonstraram que houve um crescimento significativo do número de refeições/dia consumidos por essa clientela (Tabela 1) (ABERC, 2018).

Tabela 1 - Número de refeições/dia (em milhões) produzido pelas prestadoras de serviço de refeições coletivas e refeições de convênio no período de 2010 a 2018, no Brasil.

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018*
Refeições Coletivas (Prestadoras de Serviços)	9,4	10,5	10,9	11,7	12,2	11,7	11	12	13
Refeições Convênio (Tíquetes/Cupons Restaurantes Comerciais)	5,3	6	6,4	7	7,4	7	6,8	6,9	7,4

Fonte: ABERC, 2018

*Estimativa de crescimento.

Das 12 milhões de refeições servidas em 2017, cerca de 90% foram fornecidas pelas empresas prestadoras de serviço filiadas à ABERC, que juntas responsabilizam-se por 95%

(noventa e cinco por cento) do volume desse mercado. A mesma instituição, ABERC, divulgou que o setor de refeições coletivas emprega cerca 210 mil colaboradores e esse número vêm crescendo ao longo dos anos. O mercado consumidor, que busca por refeições fora do domicílio, dentro do local do trabalho, tem uma participação significativa e crescente no setor alimentício e na geração de empregos diretos e indiretos, movimentando a economia do setor e de outros segmentos da sociedade (LEAL, 2010). Além disso, o faturamento deste tipo de serviço também tem demonstrado ser progressivo, conforme Tabela 2 (ABERC, 2018).

Tabela 2 – Demonstrativo do faturamento (em bilhões de reais) aproximado de refeições coletivas e refeições convênio no período de 2010 a 2018, no Brasil.

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018*
Refeições Coletivas (Prestadoras de Serviços)	10,8	13,4	14,7	16,6	18,3	17,8	16,9	18,2	19,3
Refeições Convênio (Tíquetes/ Restaurantes Comerciais)	8,6	9,8	11	11,9	13,9	13,3	12,4	13,3	13,9

Fonte: ABERC, 2018

*Estimativa de crescimento

De acordo com o levantamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), os serviços de alimentação subiram da sexta posição para a quarta no período de 2007 a 2015, representando 7,7% da receita operacional líquida (IBGE, 2015). Com os dados divulgados, percebe-se um crescimento desse segmento que também é oferecido para trabalhadores em todas as áreas de atuação e aos estudantes, aumentando a necessidade de cuidados na preparação e produção de alimentos para que a população tenha acesso a alimentos seguros e livres de contaminantes perigosos (LEAL, 2010). A preocupação da população e dos serviços de alimentação com a qualidade dos alimentos é crescente, porém a maioria dos consumidores não possui informações suficientes para avaliar e reivindicar melhorias (LIU et al., 2015; BEZERRA et al., 2015).

O aumento da produção de alimentos impõe maiores desafios aos profissionais que atuam na área, uma vez que as necessidades na produção de pequenas quantidades de alimentos são diferentes daquelas necessárias na produção de grandes quantidades (TONDO; BARTZ, 2014).

3.2 LEGISLAÇÃO APLICADA AOS SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO

Nos serviços de alimentação, os cuidados desde as matérias-primas, preparação até a distribuição dos alimentos devem ser adotados, a fim de garantir a inocuidade dos alimentos prontos para o consumo. O binômio tempo/temperatura é um dos principais fatores para evitar a sobrevivência e a multiplicação de micro-organismos, prevenindo a ocorrência de surtos alimentares (WHO, 2006).

No Brasil, em setembro de 2004, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso de suas atribuições, aprovou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº. 216/2004, que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação e que tem como objetivo adotar procedimentos adequados de Boas Práticas para garantir condições higiênico-sanitárias dos alimentos preparados em serviços de alimentação (BRASIL, 2004). No Rio Grande do Sul, a Portaria 78/2009 aprovou a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, a qual foi elaborada com base na RDC 216/2004 da ANVISA e incluiu outros controles (RIO GRANDE DO SUL, 2009).

Dentre os principais critérios para assegurar a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos está o controle de temperatura. Segundo a RDC 216/2004, na cocção, o tratamento térmico deve atingir 70°C em todas as partes do alimento. Em relação à temperatura de distribuição de alimentos quentes, as preparações devem ficar expostas a temperaturas superiores a 60 °C, por no máximo seis horas (BRASIL, 2004; RIO GRANDE DO SUL, 2009).

No Estado de São Paulo, a Portaria CVS 5/2013 apresenta critérios diferentes da RDC 216/2004 e Portaria 78/2009 quanto aos padrões de tempo e temperatura de alimentos frios expostos para o consumo imediato, como pode ser visualizado na Tabela 3. Essa legislação ressalta ainda, que os alimentos que não estiverem com as temperaturas dentro dos parâmetros estabelecidos sejam desprezados (SÃO PAULO, 2013).

Tabela 3 – Critérios de tempo x temperatura referente aos alimentos expostos para o consumo imediato, segundo a RDC 216/2004, a CVS 5/2013 e a Portaria 78/2009.

	RDC 216/2004		CVS 5/2013		Portaria 78/2009	
	Temperatura em °C	Tempo de exposição em horas	Temperatura em °C	Tempo de exposição em horas	Temperatura em °C	Tempo de exposição em horas
Alimentos frios	Inferior a 5°C	--	Até 10°C	Máximo 4 h	Inferior a 5°C	--
			Entre 10°C e 21°C	Máximo 2 h		
Alimentos quentes	Superior a 60°C	Máximo 6 h	Mínimo 60°C	Máximo 6 h	Superior a 60°C	Máximo 6 h
			Abaixo de 60°C	Máximo 1 h		

Fonte: Brasil, 2004; São Paulo, 2013; Rio Grande do Sul, 2009.

Nos serviços de alimentação as preparações podem ficar expostas em balcões térmicos e balcões refrigerados que, muitas vezes, apresentam temperaturas inadequadas, o que pode ocasionar o desenvolvimento de micro-organismos que poderão contribuir para o surgimento de surtos de DTA. Para garantir a qualidade das refeições é indispensável ficar atento à temperatura bem como no tempo de exposição desses alimentos (MARINHO, SOUZA, RAMOS, 2009).

Penedo et al. (2015), ao avaliarem temperaturas de distribuição de refeições frias e quentes em restaurantes de Belo Horizonte (MG), observaram que 60% dos restaurantes apresentaram inconformidades quanto à temperatura de distribuição dos alimentos. Resultados semelhantes foram encontrados por Monteiro et al. (2014), ao monitorar as temperaturas de

preparações quentes e frias em seis restaurantes em Minas Gerais. Somente um restaurante apresentou temperatura adequada nas preparações quentes. Todos os restaurantes apresentaram inadequações nas preparações frias.

Resultados diferentes foram encontrados por Frantz et al. (2008), quando analisaram os registros da temperatura de distribuição de 15 Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN), localizadas no Rio Grande do Sul. As preparações quentes apresentaram maiores percentuais de adequação (97,8%) em relação às frias (14,3%).

Em São Paulo, Alves & Ueno (2010) analisaram amostras de alimentos expostos em balcões de distribuições quentes e frias de 16 restaurantes e verificaram que 87,5% dos restaurantes estavam com os alimentos, tanto nas temperaturas quentes quanto nas temperaturas frias, inadequadas. Essa inadequação pode ter sido ocasionada pela falta de manutenção dos equipamentos onde esses alimentos foram expostos para a distribuição (MARINHO, SOUZA, RAMOS, 2009). No entanto, mesmo os alimentos estando expostos em temperaturas críticas, na maioria das vezes, isso não resulta em surto alimentar, levantando dúvidas sobre as razões desses fatos e necessidades dos controles. Estudos sobre o comportamento e a capacidade de multiplicação microbiana nos alimentos poderão contribuir na elucidação dessas dúvidas e podem contribuir na prevenção de surtos alimentares.

3.3 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva é utilizada para prever o comportamento de microorganismos através de modelos matemáticos, sendo uma ferramenta de grande importância para o planejamento, avaliação, otimização e controle de muitos processos na área alimentar. Na produção de alimentos, o desenvolvimento e aplicação de modelos matemáticos capazes de descrever de forma precisa o comportamento de uma variável em estudo, é de grande

importância para a previsão das características finais dos produtos e sua contaminação (MILLER et al., 2004).

Estudos de microbiologia preditiva permitem predizer parâmetros como, por exemplo, a taxa de multiplicação dos micro-organismos em relação a vários fatores como a temperatura, umidade, pH e outras condições de armazenamento e distribuição. Os resultados desses estudos podem auxiliar em análises de riscos, na avaliação da vida útil dos produtos alimentícios, no desenvolvimento de processos e produtos e, por fim, pode ajudar nas tomadas de decisões referentes à segurança e qualidade dos alimentos (OLIVEIRA et al., 2013).

Segundo Whiting & Buchaan (1993), os modelos matemáticos podem ser classificados em modelos primários e modelos secundários. O modelo primário corresponde ao modelo que descreve a multiplicação microbiana em função do tempo, sob determinadas condições ambientais ou de cultivo. São utilizados para este modelo, parâmetros, como exemplo, número inicial de células, taxa de multiplicação, tempo de fase lag e densidade populacional máxima (WHITING, 1995; McDONALD & SUN, 1999; McMEEKIN et al., 2002; KAJAK & KRAJEWSKA, 2006). Já os modelos secundários descrevem a resposta dos parâmetros dos modelos primários em função da variação de uma condição ambiental (WHITING, 1995; McDONALD & SUN, 1999; NAKASHIMA et al., 2000; McMEEKIN et al., 2002; MARKS, 2008). Eles podem descrever a variação da taxa de multiplicação de micro-organismos em função da temperatura ou do pH. Os modelos que avaliam as variações de temperaturas, como o modelo da raiz quadrada (RATKOWSKY et al., 1982), são os mais utilizados (WHITING; BUCHAN, 1993), visto que a temperatura é o principal fator que afeta a multiplicação de micro-organismos e pode mudar durante o período que o alimento está sendo processado e ainda durante o armazenamento ou distribuição.

O programa *ComBase Predictive Model* é um dos programas disponíveis capazes de simular parâmetros cinéticos de multiplicação de micro-organismos, fornecendo importantes

informações quanto ao comportamento microbiano nos alimentos. Os modelos são baseados no comportamento de populações microbianas, na multiplicação ou velocidade de multiplicação de micro-organismos de interesse, em função do tempo.

Parâmetros cinéticos de multiplicação podem ser preditos pelo modelo de Baranyi (BARANYI, ROBERTS, 1994), o qual está representado nas Equações 1, 2 e 3.

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

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

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

Onde:

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

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

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

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

q_0 [-] = parâmetro que expressa o estado fisiológico das células em $t = t_0$;

t = tempo;

λ = tempo da fase *lag* (h);

Com a finalidade de avaliar a influência da temperatura sobre os parâmetros cinéticos gerados pelo modelo primário, o modelo secundário de Ratkowsky (RATKOWSKY et al.,

1982), descreve μ (taxa de multiplicação) e λ (tempo de fase *lag*) em função da temperatura de armazenamento e distribuição, e está representado na (Equação 4).

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

Onde:

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

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

T = temperatura de armazenamento (°C);

T_0 = temperatura mínima conceitual para a multiplicação microbiana.

Para avaliar o desempenho dos modelos construídos, os valores do coeficiente de determinação (R^2) e do erro quadrático médio (RMSE) estão representados pela Equação 5 e Equação 6, respectivamente. O R^2 é geralmente considerado uma medida geral da predição calculada pelo modelo desenvolvido, e quanto mais próximo de 1 o valor estiver, melhor o desempenho do modelo. Já o RMSE é utilizado para oferecer uma medida padrão da adequação de um modelo com os dados utilizados para produzi-lo. Um RMSE de 0 indica o melhor ajuste possível entre os valores preditos e observados (OH et al., 2012; WANG et al., 2013).

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

Onde:

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

y_i = valor observado;

\hat{y}_i = valor predito.

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

Equação 6

Onde:

n = número de observações;

μ = valor observado;

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

Com estes modelos, é possível obter informações quanto ao comportamento dos micro-organismos inoculados em diferentes alimentos e submetidos a temperaturas variadas, e prever em qual temperatura e qual o tempo de exposição essas preparações podem permanecer em *buffets* de restaurantes industriais, garantindo a segurança desses alimentos prontos para o consumo sem comprometer a qualidade dos mesmos.

3.4 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA)

Uma vez que as refeições para a coletividade são, muitas vezes, produzidas em larga escala, torna-se difícil o controle efetivo em todas as etapas de produção e isso pode trazer diversos riscos para consumidores, destacando-se entre eles as DTA.

Tanto alimentos de origem animal, quanto alimentos de origem vegetal podem ser envolvidos com DTA. No passado, o controle prioritário ocorria sobre os alimentos de origem animal, contudo, hoje em dia, alimentos vegetais também são bastante controlados. Por exemplo, na Europa, diversos micro-organismos patogênicos têm sido veiculados por vegetais causando importantes surtos alimentares, tais como *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* (RUBINO, CAPPUCINELLI, KELVIN, 2011). De acordo com o *Center for*

Science in the Public Interest, no período de 2001-2010, nos Estados Unidos, ocorreram 235 surtos alimentares, sendo que 11.839 pessoas adoeceram (CSPI, 2013).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, entre 2007 e outubro de 2017, ocorreram 7.170 surtos de DTA. Dentre esses surtos, 57,1% dos alimentos não foram identificados (BRASIL, 2017). No período de 2000 a 2017, a *Salmonella* spp. foi o principal agente causador de DTA, no Brasil. Em segundo lugar, a *Escherichia coli*, seguido por *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2018). A investigação e a associação dos surtos registrados a alimentos no Brasil ainda enfrentam dificuldades técnicas e financeiras, portanto, o cruzamento de dados entre o alimento que causou o surto e a sua origem (produção primária, preparação, distribuição, entre outros), ainda é de difícil realização.

Em vista disso, o controle da segurança dos alimentos necessita de monitoramento em todo o processo produtivo, desde a seleção da matéria-prima até o consumo, garantindo a segurança e a inocuidade dos alimentos. Nos últimos anos, na busca de uma alimentação saudável, o consumo de frutas e vegetais tem aumentado (PBH, 2016) e o cuidado no fornecimento desses alimentos para o consumo deve ser controlado, haja vista, que normalmente, estes produtos são consumidos crus sem qualquer tipo de processamento que possa inativar micro-organismos existentes (CARRASCO et al., 2012; ZWEIFEL & STEPHAN, 2012), e se não forem higienizados corretamente podem ocasionar DTA (LEFF & FIERER, 2013).

3.5 EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS

Nos serviços de alimentação são utilizados equipamentos e utensílios para as mais diversas atividades. Dentre os equipamentos, os considerados críticos são os que entram em contato direto com os alimentos como, por exemplo, moedores, fatiadores, processadores,

picadores, liquidificadores e batedeiras, além daqueles que conservam os alimentos em temperaturas adequadas.

Kochanski, et al. (2009) demonstraram que os processadores manuais apresentaram uma contaminação média de $1,53 \times 10^4$ UFC/cm² de micro-organismos mesófilos aeróbios, isso se ocorreu provavelmente, pela dificuldade de higienização destes equipamentos. Os equipamentos quando não são apropriadamente limpos e desinfetados podem causar contaminação cruzada nos alimentos. Dentre os alimentos mais difíceis de serem higienizados, destacam-se os liquidificadores, moedores de carne e picadores de legumes. De forma geral, os picadores não são totalmente desmontáveis para a higienização e, devido ao seu *design*, alimentos e micro-organismos permanecem aderidos entre as lâminas, podendo ocasionar contaminação cruzada.

A sobrevivência da *Salmonella* spp. nas superfícies secas dos equipamentos e utensílios utilizados nas indústrias e serviços de alimentação pode ser um dos fatores mais importantes na contaminação dos alimentos e, como consequência, ocasionar infecção transmitida por estes micro-organismos (IIBUCHI et. al., 2010). Mesmo que os serviços de alimentação possuam Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) de higienização descrito, muitas vezes, a sua implementação e supervisão não ocorrem com a devida eficácia e, como consequência, há a formação de biofilmes ocasionada pela higienização inadequada de equipamentos que entram em contato com os alimentos, como os picadores de legumes, por exemplo.

A higienização é um dos principais itens de Boas Práticas que devem ser seguidos em serviços de alimentação para que as instalações, equipamentos, móveis e utensílios sejam mantidos em condições higiênico-sanitárias apropriadas. Segundo a RDC 216/2004, é obrigatória a implementação de um POP relacionado à higienização de instalações, equipamentos e móveis (BRASIL, 2004).

Outro fator importante, é que a ação do sanitizante pode não ser eficiente sobre as bactérias formadoras de biofilme, como a *Salmonella*, e se esse micro-organismo permanecer sobre superfícies de equipamentos e utensílios pode posteriormente contaminar alimentos e ocasionar surtos de DTA (MILAN, et al., 2015). Murmann et al. (2008), relataram um surto de salmonelose com beterraba cozida que ocorreu no Rio Grande do Sul e que a fonte de contaminação mais provável foi o picador utilizado no corte desse vegetal. Além disso, também pode ter contribuído para essa contaminação, a higiene inadequada das mãos dos manipuladores de alimentos, a dificuldade de refrigerar grandes quantidades de beterraba cozida antes do corte, a temperatura inadequada de armazenamento da beterraba picada antes de servir e o longo tempo de distribuição.

3.6 MICRO-ORGANISMOS DE INTERESSE NA PESQUISA

No Brasil e no Rio Grande do Sul, *Salmonella* spp. tem sido um dos principais patógenos envolvidos com surtos alimentares (BRASIL, 2017).

Já, *Listeria monocytogenes*, no nosso país, não se tem registros de surtos alimentares por esse micro-organismo, no entanto, já foi encontrada em produtos de origem animal (FARBER & PETERKIN, 1991; RAMASWAMY et al., 2007; SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007; VON LAER et al., 2009; ADZITEY & HUDA, 2010). Recentemente, na África do Sul, foi relatado o maior surto de listeriose alimentar do mundo, envolvendo um embutido de carne chamado *Polony*. *L. monocytogenes* foi responsável por pelo menos 203 mortes e uma grave crise no setor de alimentos desse país (ONUBR, 2018).

No presente estudo, a *Salmonella* spp. e a *L. monocytogenes* foram escolhidas para simular a multiplicação desses patógenos em diferentes temperaturas no software ComBase e além disso, por serem patógenos alimentares importantes no Brasil e no mundo, atualmente. Abaixo serão descritas algumas das características desses micro-organismos.

3.6.1 *Salmonella* spp.

Salmonella é um gênero da família *Enterobacteriaceae*. São Gram-negativas, mesófilas, anaeróbias facultativas, não formadoras de endósporos e têm morfologia de bastonetes. Possui temperatura mínima de multiplicação de 5°C e temperatura ótima de aproximadamente 38°C, podendo ser destruídas a 60°C por 15 a 20 minutos. Possui dose infectante de 10⁶ a 10⁸ UFC/g, porém já foram relatados surtos com menos de 10 células envolvendo queijo tipo cheddar e de 50 a 100 células envolvendo chocolate, por esse motivo se aceita que 1 UFC/g possa causar surtos alimentares (FORSYTHE, 2013). Este gênero é composto por apenas duas espécies, *enterica* e *bongori* e possui sorovares patogênicos que causam infecções, como *Salmonella* não tifóides, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Enteritidis (FORSYTHE, 2013; WHO 2013; CDC 2016).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a alta prevalência de DTA por *Salmonella* é descrita desde 1990 (Braden & Tauxe, 2013; WHO 2013), sendo responsável por 15% das DTA no mundo (WHO, 2018). A salmonelose humana é a doença de origem alimentar bacteriana com maior ocorrência em nível mundial (WADAMORI et al., 2017). Nos Estados Unidos, em 2017, *Food and Drug Administration* (FDA) investigou um surto de *Salmonella* Urbana em mamão papaia em vários estados. As evidências epidemiológicas relatadas indicaram que o produto originário de 4 fazendas do México, era provavelmente a fonte de contaminação deste surto, sendo que 4 pessoas foram hospitalizadas e não houve registro de óbito (CDC, 2017). Em 2018, 246 pessoas foram infectadas em 25 estados americanos com *Salmonella* Newport, provavelmente por carne bovina contaminada, sendo que 59 pessoas foram hospitalizadas e não houve registro de mortes (CDC, 2018).

De acordo com os dados divulgados pelo Ministério da Saúde, no Brasil, em 2018, a *Salmonella* foi o principal patógeno envolvido em surtos, representando 32% do total de agentes etiológicos identificados (BRASIL, 2018). No Rio Grande do Sul, desde 1993, a *Salmonella*

Enteritidis (SE86) é o principal agente causador de surtos no Estado (TONDO & RITTER, 2012; TONDO et al., 2015).

Além disso, cepas de *Salmonella* spp. têm sido associadas a vários surtos envolvendo produtos frescos (SANT'ANA et al., 2011; OLAIMAT & HOLLEY, 2012; TOMAS-CALLEJAS et al., 2012; BENNETT et al., 2015). Ainda, falha nas etapas de preparo desses alimentos podem aumentar o risco de contaminação desses produtos até chegar ao consumidor. Outro fator importante, é que a desinfecção pode não garantir a destruição dos micro-organismos que possam estar presentes nas superfícies de vegetais (HOLVOET et al., 2012; GIL et al., 2015; MAHAJAN et al., 2014; WHOa, 2015).

3.6.2 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria* é uma bactéria Gram positiva, não esporulada, multiplica-se entre as temperaturas de 0 e 42°C. Ao contrário de outros patógenos de origem alimentar, a *Listeria* pode multiplicar-se, mesmo que vagorosamente, em temperaturas de refrigeração (FORSYTHE, 2013). A espécie *L. monocytogenes* é a principal causadora de DTA em humanos (EFSA, 2014; CASARIN et al. 2016). Causa uma doença denominada listeriose, com baixa ocorrência, porém com alta taxa de letalidade, principalmente em pessoas imunodeprimidas, idosos, grávidas e seus bebês, com taxa de mortalidade de 20% ou mais dos casos (SLEATOR et al., 2009; AUVOLAT & BESSE, 2016).

Scallan et al. (2011) apresentou dados dos surtos nos Estados Unidos, em 2006, que em média 94% das vítimas de listeriose necessitaram de hospitalização e 15% dessas vítimas morreram. Na Suíça, entre 2013/2014, ocorreram quatro surtos de listeriose, envolvendo salada minimamente processada (STEPHAN et al., 2015). Alguns autores relatam que alimentos prontos para o consumo, mantidos sob refrigeração e que não são aquecidos antes de serem consumidos, como por exemplo, derivados de produtos lácteos, carnes, frutos do mar e vegetais,

estão entre os alimentos mais envolvidos em surtos por *L. monocytogenes* (FARBER & PETERKIN, 1991; RAMASWAMY et al., 2007; SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007; ADZITEY & HUDA, 2010).

Estudo realizado por Leong D., Alvarez-Ordóñez, A. & Jordan, K. (2014) na Irlanda, entre 2013 e 2014, em 48 empresas de processamento de alimentos, entre elas 18 empresas de laticínios, 12 de carnes, 8 frutos do mar e ainda 6 empresas de vegetais minimamente processados, das 432 amostras de alimentos analisadas, foram observadas uma prevalência de 5,3% de *L. monocytogenes* nas amostras analisadas. Amostras de alimentos positivos foram obtidas de todos os setores de alimentos e incluíram amostras de queijo, salmão defumado, suco de maçã, cogumelos, leite, linguiça, pudim, gamão, recheio e frango.

Desde 2015, na Áustria, Dinamarca, Finlândia, Suécia e Reino Unido, milho congelado e possivelmente outros vegetais congelados são a fonte provável de um surto de *L. monocytogenes*. Em 2018, já foram notificados 47 casos, incluindo 9 mortes. As mesmas estirpes de *L. monocytogenes* foram detectadas em vegetais congelados produzidos por uma empresa húngara em 2016, 2017 e 2018. Isto sugere que as estirpes persistiram na fábrica apesar dos procedimentos de limpeza e desinfecção que haviam sido realizados (EFSA, 2018).

Esse patógeno pode entrar na cadeia de produção através da contaminação cruzada das superfícies, pelos materiais utilizados na produção de alimentos, pela matéria-prima, manipuladores, insetos, água e ar (AUTIO et al., 1999; LIN et al., 2006; PAPADOPOULOU et al., 2012). A longa vida de prateleira de certos produtos e a pouca quantidade de micro-organismos competidores favorecem a multiplicação de *L. monocytogenes*, aumentando o risco para o consumidor (SUIHKO et al., 2002; KESKINEN et al., 2008). Então, obter informações referente ao comportamento desses micro-organismos nos alimentos, poderá ser de grande valor para os serviços de alimentação, tendo em vista o grande volume de refeições servidas diariamente, fornecendo parâmetros como, por exemplo, a taxa de multiplicação em diferentes

cenários de temperaturas, gerando subsídios para importantes tomadas de decisões, garantindo o controle da qualidade e da segurança dos alimentos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DE DADOS

De maio a dezembro de 2015, mais de 10.000 planilhas de controle de temperatura de distribuição foram escaneadas e enviadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Controle de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA / UFRGS) para serem analisadas. As planilhas digitalizadas vieram de 377 restaurantes industriais de uma empresa multinacional de serviços de alimentação coletiva, localizadas em todas as cinco macrorregiões do Brasil. As macrorregiões foram compostas pelos seguintes estados brasileiros: 1) região Sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná); 2) região Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo); 3) região Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul); 4) região Nordeste (Alagoas, Bahia, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Ceará); e 5) região Norte (Amazonas e Tocantins).

Os serviços de alimentação ofereciam um cardápio diário com preparações frias e preparações quentes que eram distribuídas e consumidas no mesmo dia. As temperaturas das refeições foram medidas diretamente do equipamento de distribuição (ex. *Buffet*) no mesmo restaurante industrial onde a comida foi preparada para a hora do almoço. Normalmente, a distribuição durante a hora do almoço ocorre das 11h às 14h, mas pode atingir no máximo 6 horas. O procedimento de medição de temperatura dos alimentos foi realizado por manipuladores de alimentos treinados, utilizando termômetros de metal calibrados por método padronizado pela empresa que pertencia a todos os restaurantes industriais.

Para este estudo foram utilizados os registros de temperaturas de distribuição de alimentos quentes e frios. Assumiu-se que temperaturas abaixo de 1°C para refeições frias e acima de 105°C para refeições quentes foram inadequadamente registradas e, portanto, excluídas do banco de dados. As temperaturas dos alimentos transportados não foram incluídas

neste estudo. Os alimentos mais consumidos foram identificados, e suas temperaturas foram digitadas em planilhas *Excel 2016 (Microsoft, EUA)* para serem analisadas.

Além disso, as temperaturas das preparações frias, que foram pré-cozidas (beterraba, cenoura, couve-flor, grão-de-bico e pudim) e foram então resfriadas antes de serem colocadas para distribuição, foram classificadas como resfriadas. Alface e repolho foram classificados como não resfriados. Preparações quentes foram identificadas com molho e sem molho.

Registros de temperaturas das planilhas analisadas foram de março e julho de 2015. O mês de março foi escolhido com o objetivo de representar o verão, enquanto julho representou o inverno. Os dados de temperatura ambiental de cada uma das capitais foram obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Com o intuito de identificar a influência da temperatura externa na distribuição dos alimentos, registrou-se a temperatura externa das 10h às 12h e calculou-se a média diária e mensal de cada capital, de acordo com os dados fornecidos pelo INMET.

Para acessar o horário de distribuição dos serviços de alimentação dos restaurantes industriais localizados no Rio Grande do Sul, os mesmos foram visitados e escolhidos por conveniência. Os dados sobre distribuição e tempo de reposição das refeições na distribuição foram coletados junto à equipe de Segurança Alimentar e Qualidade da empresa e foram realizadas inspeções visuais nos serviços de alimentação. Além disso, foram utilizados parâmetros da legislação nacional sanitária, RDC 216/2004 (BRASIL, 2004).

4.2 INSERÇÃO DE DADOS NA DISTRIBUIÇÃO

Os dados foram organizados em planilhas *Excel* e foram montados em distribuições, utilizando o software *@Risk (Palisade Corporation, versão 7.5)*, por simulação de Monte Carlo. Este *software* foi escolhido porque fornece a flexibilidade de analisar dados em vários formatos.

Para ajustar os dados de temperatura, os dados foram testados para várias distribuições: *Normal*, *Weibull*, *Triangular*, *Logística*, *Pert*, *Beta Geral*, *Lognormal*, *Exponencial* e *Uniforme*. Para cada refeição, as diferentes distribuições foram classificadas de acordo com a Raiz do Erro Quadrático Médio (RMSE) como uma medida da qualidade do ajuste e as escolhas das distribuições foram feitas de acordo com o estudo de (ROCCATO, UYTENDAELE, & MEMBRÉ, 2017). Assim, a melhor distribuição de ajuste foi fornecida pelo valor RMSE mais baixo calculado. Todas as temperaturas utilizadas para encontrar o melhor ajuste de distribuição foram aquelas compiladas a partir do cenário real de acordo com os alimentos selecionados para este estudo.

Para ajustar os dados de tempo, a distribuição *Pert* foi escolhida. A distribuição *Pert* foi considerada como a distribuição mais apropriada para se adequar aos dados de tempo, uma vez que permitiu estimar o tempo de conclusão com base nas melhores estimativas de valores mínimos, máximos e mais prováveis para um evento (HAZEWINKEL, 1994).

4.3 CRESCIMENTO PREDITIVO DE PATÓGENOS EM REFEIÇÕES FRIAS

Baseado dos dados que a maioria das não conformidades foram observadas nas temperaturas de distribuição dos alimentos frios, diferentes cenários foram desenvolvidos para esses alimentos e a predição da multiplicação de patógenos. *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* foram escolhidos porque ambos são importantes patógenos alimentares em todo o mundo. Além disso, *Salmonella* é o micro-organismo mais envolvido em surtos de origem alimentar no Brasil (Brasil, 2018) e *L. monocytogenes* é um importante patógeno psicotrófico que cresce em temperatura de refrigeração (MENA et al., 2004; AZEVEDO et al., 2005).

O software *ComBase Predictor* foi usado para prever o comportamento de ambos os patógenos e, foram selecionados os modelos de crescimento estático. O tempo de 6 horas foi

delimitado, pois foi o tempo máximo de distribuição observado nos restaurantes industriais. Além disso, é o tempo máximo permitido pela legislação brasileira para que os alimentos sejam distribuídos em serviços de alimentação (BRASIL, 2004). Temperaturas de 7, 10, 15, 21, 36,5 e 40°C foram utilizadas para *Salmonella* spp. e 1, 5, 10, 15, 21, 36,5 e 40°C para *L. monocytogenes*, com um nível inicial de 1 log UFC/g. As temperaturas mínima e máxima foram escolhidas de acordo com os limites preconizados pelo *ComBase Predictor* para cada micro-organismo.

Os valores de pH e atividade de água (a_w) da couve-flor, grão-de-bico, alface e pudim foram encontrados na literatura (FDA, 2003; NAKAEDO, AMARAL, PENNA, 2004; BARBOSA-CÁNOVAS et.al., 2007). As amostras de beterraba, repolho e cenoura foram submetidas à análise de pH utilizando um pHmetro de bancada (Modelo Q400A, Quimis, Brasil) e atividade de água (a_w) utilizando um medidor de atividade de água AquaLab (Modelo 3TE, Decagon Devices, EUA). Todos os valores de pH e a_w usados no ComBase foram mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: pH e atividade de água (a_w) das refeições frias avaliadas

Alimentos	pH	a_w	Fonte
Beterraba	5.7	0.986	(deste estudo)
Repolho	6.02	0.999	(deste estudo)
Couve-flor	6.62	0.990	FDA, 2003; BARBOSA-CÁNOVAS et..al., 2007
Cenoura	5.85	0.999	(deste estudo)
Grão-de-bico	6.64	0.99	FDA, 2003; GOWAN A., 2007
Alface	5.97	0.996	FDA, 2003; BARBOSA-CÁNOVAS et.al., 2007
Pudim	7.02	0.97	NAKAEDO, AMARAL, PENNA, 2004; BARBOSA-CÁNOVAS et.al., 2007

O cenário real foi baseado nas temperaturas de distribuição encontradas neste estudo. Os modelos preditivos secundários foram construídos usando a equação de raiz quadrada

descrita por Ratkowsky et al. (1982) para descrever μ como uma função da temperatura de armazenamento. Os valores de μ foram preditos pelo *Combase*. O crescimento preditivo de *Salmonella* e *L. monocytogenes* foi calculado no @Risk, usando a relação entre a taxa de crescimento e a temperatura de distribuição ajustada. O crescimento de ambos os patógenos durante a distribuição dos alimentos foram calculados pela multiplicação do crescimento previsto, pelo tempo de distribuição ajustado.

4.4 CONTAMINAÇÃO NATURAL DOS PICADORES DE VEGETAIS

Foram visitadas cozinhas industriais (n=23) localizadas no Estado do Rio Grande do Sul (Brasil) e avaliado um cortador de legumes por estabelecimento (n=23). Essas cozinhas industriais produziam juntas aproximadamente 18.500 refeições diárias, o volume de refeições produzidas variou de 200 a 5.450 refeições/dia e a maioria (n=15) produzia uma média de 300 refeições/dia. Todas as cozinhas industriais tinham Manual de Boas Práticas de Higiene, Procedimentos Operacionais Padronizados (POPs) implementados e um nutricionista como profissional responsável pelo controle de procedimentos de produção e segurança dos alimentos.

4.4.1 Análise microbiológica

As superfícies das lâminas dos picadores de vegetais foram analisadas pela técnica de *swab* descrita pela American Public Health Association (APHA, 2015). O *swab* foi aplicado com pressão sobre as lâminas do picador de vegetais, de modo que toda a superfície do algodão entrasse em contato com a amostra. Em seguida, os tubos com *swabs* foram enviados para o Laboratório de Microbiologia dos Alimentos ICTA/UFRGS.

No laboratório, cada tubo de vidro contendo 10 ml e o *swab* dentro, foi agitado em vórtex durante 10 segundos, e depois submetido a duas diluições decimais em 0,1% de solução salina peptona. Para a contagem total de micro-organismos aeróbicos mesófilos, 0,1ml de cada diluição decimal foram espalhados em Ágar de Contagem de Placa (PCA) em duplicata (Merck, Darmstadt, Alemanha) e as placas foram incubadas em incubadora bacteriológica a 37°C por 48h.

As contagens de Enterobacteriaceae e coliformes termotolerantes foram realizadas espalhando 0,1 ml de cada diluição decimal em duplicata em Àgar Biliar Crystal Violet Neutro Vermelho (VRBA) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e as placas foram incubadas invertidas em incubadora bacteriológica a 37°C por 48h. A confirmação dos coliformes termotolerantes foi realizada inoculando colônias típicas isoladas em VRBA em tubos de vidro contendo caldo EC (Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubando-as em banho-maria a 45°C.

A presença de *Salmonella* spp. foi realizada adicionando 5 ml de solução salina peptona a 0,1% contendo os swabs em 45 ml de solução salina de peptona tamponada a 1% e incubando-a durante 24h numa incubadora bacteriológica a 37°C. Após a incubação, 1ml da suspensão bacteriana foi transferida para o caldo Selenito-Cistina (Acumedia, São Paulo, Brasil) e incubada a 37°C por 18 horas e 0,1ml para o caldo Rappaport-Vassiliadis (Merck, Darmstadt, Alemanha). incubado a 41,5°C durante 18 horas. Depois disso, uma alçada de cada caldo foi espalhada em ágar Xylose Lisina Deoxycholate (XLD) (HiMedia, Mumbai, Índia) e Brilliant Green Agar Base (BPLS) (Merck, Darmstadt, Alemanha), e colônias típicas de *Salmonella* foram pesquisadas após 24h de incubação a 37°C. Colônias típicas de *Salmonella* spp. foram submetidos a testes bioquímicos de acordo com a Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003).

4.5 MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE *SALMONELLA* EM VEGETAIS

4.5.1 Beterraba cozida

As beterrabas foram cozidas, descascadas e cortadas usando um picador de vegetais tipo “aranha”, não contaminado, (mesmo modelo utilizado nas cozinhas industriais) e amostras de 10g foram colocadas dentro de sacos plásticos estéreis e identificadas.

4.5.2 Cenoura cozida e repolho cru

Todos os vegetais foram adquiridos em um supermercado na cidade de Porto Alegre, no Estado do Rio Grande do Sul, sul do Brasil. Cerca de 600 g de cenouras foram cozidas em água fervente por 20 minutos, até ficarem macias. Após o cozimento, as cenouras foram resfriadas em temperatura ambiente até atingir 30°C. Após, foram descascadas e cortadas. As folhas externas do repolho foram removidas e cortadas em tiras finas usando uma placa de corte de vidro e uma faca estéril. Amostras contendo 10g de cenouras cozidas e o repolho cru foram colocados dentro de sacos plásticos estéreis separadamente e identificados.

4.5.3 Contaminação artificial de *Salmonella* em beterraba, cenoura e repolho

Para avaliar o crescimento de *Salmonella* em beterrabas e cenoura cozidas e repolho cru, um grupo de seis diferentes cepas de *Salmonella* foram utilizadas: *Salmonella* Enteritidis SE86, *Salmonella* Typhimurium L12031, *Salmonella* Typhimurium 1T2, *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Newport e *Salmonella* Saint Paul. Todas as cepas vieram da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS).

As cepas de *Salmonella* foram cultivadas separadamente em 5 ml de BHI (Merck, Darmstadt, Alemanha), a 37°C por 24 horas. As culturas foram centrifugadas, separadamente, a 4°C, durante 10 min, a 2810 g. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram

lavados com água peptonada a 0,1%. Este procedimento foi repetido 3 vezes. Em seguida, as células foram ressuspensas com água peptonada a 0,1% e todas as cepas de *Salmonella* foram misturadas para obtenção do *pool*, atingindo concentração celular final de 10^8 UFC/ml, confirmada por plaqueamento em XLD (HiMedia, Mumbai, Índia) e PCA (Kasvi, Paraná, Brasil).

Diluições decimais seriadas foram preparadas usando água peptonada a 0,1%. A beterraba cozida já embalada em sacos estéreis e foi contaminada artificialmente com o *pool* de *Salmonella*, atingindo uma concentração final de células de 3 log UFC/g. Depois disso, as amostras foram homogeneizadas por 1min com um *stomacher* (Stomacher 400 Circulator Seward, Reino Unido) e armazenadas a 7, 10, 20, 30 e 38°C em diferentes períodos.

As contagens de *Salmonella* foram realizadas de acordo com Elias, Noronha e Tondo (2018). O modelo preditivo primário descrito por Baranyi e Roberts (1994) foi utilizado para calcular os parâmetros de crescimento cinético. As curvas de crescimento para cada temperatura foram construídas ajustando os dados experimentais à versão DMFit 2.1 do Baranyi (add-in www.ifr.ac.uk/safety/DMfit). Os seguintes parâmetros foram obtidos: 1) taxa máxima de crescimento (μ); 2) tempo de atraso (λ) e 3) densidade populacional máxima. O modelo secundário preditivo foi construído utilizando os modelos de raiz quadrada descritos por Ratkowsky et al. (1982) para descrever μ como uma função da temperatura de armazenamento. Medidas do coeficiente de determinação (R^2) foram utilizadas para avaliar o desempenho dos modelos construídos neste estudo. O R^2 foi considerado como uma medida global da previsão calculada pelo modelo desenvolvido, e quanto mais próximo de 1, melhor o desempenho do modelo (Wang et al., 2013).

O Erro Quadrático Médio (RMSE) foi utilizado neste estudo e indica a melhor possibilidade de ajuste entre os valores preditivos e observados, e quanto mais próximo de 0 (zero), melhor o desempenho dos modelos (OH et al., 2012; WANG et al., 2013). Além disso,

parâmetros intrínsecos da beterraba cozida (pH de 5,7 e aw de 0,986), cenoura cozida (pH 5,85 e aw 0,999) e repolho cru (pH 6,02 e aw 0,999) foram inseridos no *ComBase Predictor* para comparações adicionais deste estudo.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente usando o *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS versão 21.0, Chicago, IL)*. A estatística descritiva (máximo, mínimo, intervalo interquartil e mediana) e não-paramétrica (ANOVA e teste de Mann-Whitney) foram realizadas para verificar se existia diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Além disso, os dados foram inseridos no *Microsoft® Office Excel® 2013* e foi realizado teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparações estatísticas. As distribuições de prevalência, considerando as incertezas e a probabilidade de contaminação foram simuladas usando o programa *@Risk student versão 7.5*. Para todas as comparações estatísticas, foi utilizado um nível de significância de 0,05.

5. RESULTADOS

Os materiais, os métodos assim como os resultados da presente Tese são apresentados na forma de três artigos científicos:

ARTIGO 1. Assessing the food distribution temperatures and *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* predictive growth in real and simulated scenarios

Foi submetido a revista científica internacional: *Food Research International*

ARTIGO 2. Assessing *Salmonella* spp. growth and transfer from artificially contaminated vegetable choppers to cooked beets

Foi submetido a revista científica internacional: *Journal of Food Science and Technology*

ARTIGO 3. Predictive models for growth of *Salmonella* spp. in cooked carrots and raw cabbage

Foi submetido a revista científica internacional: *Journal of Food Science and Technology*

5.1 Artigo Científico 1

Assessing the food distribution temperatures and *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* predictive growth in real and simulated scenarios

Elis Regina Gomes Alfama ^a; Claudia Titze Hessel ^a; Susana de Oliveira Elias ^a; Cris Rocha Pinto Magalhães ^a; Mariângela Flores Terra Santiago ^a; Margarida Anschau ^a; Eduardo Cesar Tondo ^a

^a Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, CEP. 91.501-970 Porto Alegre/RS, Brasil.

ABSTRACT

Food distribution temperatures are one of the most important factors to be controlled in order to prevent foodborne illnesses in food services. In this study, 339.548 records of foods temperatures were collected inside Corporate Catering Food Services (CCFS) and were analyzed aiming to identify different scenarios and possible *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* predictive growth. Results demonstrated that data fitting showed Beta General distribution as the most appropriate to describe distribution temperature for most of cold meals and the Triangular distribution for hot meals. Temperature scenarios and intrinsic parameters of the most consumed cold meals were considered to predict *Salmonella* and *L. monocytogenes* growth using ComBase models. *Salmonella* exposed to temperatures of 7, 10, 15, 21, 36.5 and 40 °C was able to growth from 0.11 to 1.06 log CFU/g after 6 hours, considering this period as the maximum time of distribution of foods. *L. monocytogenes* exposed to temperatures of 1, 5, 10, 15, 21, 36.5 and 40 °C showed growth between 0.05 and 2.09 log CFU/g during the same period. According to the predictive model *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* were not able

to grow on cold foods stored for 6 hours at the temperatures below 10 °C. These temperatures could be suggested as safe to distribution of cold foods in periods shorter than in 6 hours in CCFS. To prevent microbial multiplication in different distribution scenarios to control the time distribution is required.

Keywords: Food temperature; Holding temperature; Time distribution; Catering; Food safety assessment; Probability distribution; Predictive model.

1 Introduction

In order to guarantee food safety in food services several actions must be carried out concerning hygiene practices, adequate food handling, prevention of cross-contamination and time and temperature control (Onyeneho & Hedberg, 2013). Among these control measures, time and temperature controls have particular importance, once those are probably the two main factors affecting microbial growth (Adams & Moss, 2008; Roccatò, Uyttendaele, & Membré, 2017).

It is already demonstrated that some of the most important factors contributing to foodborne outbreaks in food services are related to failures in the control of temperatures during cooking, cooling, storage and distribution of foods (Cunha et al., 2016; Rosset et al., 2004; Carneiro et al., 2015; Schaffner et al., 2015). This later is one of the most difficult issue to be controlled, because the temperatures of food during distribution depend on the quality of the equipment, type of food, type of dishes were food are exposed and environmental temperature. The variation in the time and temperature binomial during food distribution may result in several different scenarios, which influence microbiological growth and the risk of foodborne diseases.

Mathematical and distribution models can be used to predict microbial growth in foods exposed to different temperatures. This can be used also to estimate risks for the consumer

associated with biological hazards in foods (CAC, 1999; Zwietering, 2015). The information generated by these tools may generate scientific evidences, making it possible to reduce uncertainty and consequently the risks.

The objective of this study was to analyze food distribution temperatures and predict *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* growth in real and simulated distribution temperatures scenarios.

2 Materials and Methods

2.1 Data Collection

From May to December 2015, more than 10.000 distribution temperature control spreadsheets were scanned and sent to the Food Microbiology and Food Control Laboratory at Institute of Food Science and Technology (ICTA/UFRGS) in order to be analyzed. Scanned spreadsheets came from 377 Corporate Catering Food Services (CCFS) located in all five macro-regions of Brazil. The macro-regions were composed by the following Brazilian states: 1) Southern region (Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná); 2) Southeast region (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro and Espírito Santo); 3) Midwest region (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul); 4) Northeast region (Alagoas, Bahia, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte and Ceará); and 5) North region (Amazonas and Tocantins).

The food services offered a daily menu with at least three cold and five hot meals which were prepared, distributed and consumed in the same day. The temperatures of the meals were measured directly from distribution equipment (*ex. buffet*) in the same CCFS where the food was prepared for lunchtime. Usually, the distribution during the lunch time occurs from 11 AM to 2 PM, but could reach at maximum 6 hours. The procedure of measuring temperature of

foods was carried out by trained food handlers, using calibrated metal axe thermometers by method standardized by the company which all the CCFS belonged.

Distribution temperature records of hot and cold foods were used in this study. It was assumed that temperatures below 1 °C for cold meals and above 105 °C for hot meals were inappropriately recorded and so excluded from the database. The temperatures of transported foods were not included in this study. The most consumed food meals were identified, and their temperatures were written in Excel 2016 (Microsoft, USA) worksheets to be analyzed.

Furthermore, the temperatures of the cold preparations, which were pre-cooked (beet, carrot, cauliflower, chickpeas and pudding) and were then cooled before being placed for distribution, were classified as cooled. Lettuce and cabbage were classified as not cooled. Hot preparations were identified when had sauce or not.

Temperature records of spreadsheets fulfilled in March and July 2015 were analyzed. The month of March was chosen aiming to represent summertime, while July represented wintertime. Environmental temperature data of each state capitals were obtained from the National Institute of Meteorology (INMET). In order to identify the influence of external temperature in distribution food temperatures, the environmental temperature of 10 AM and 12 AM were recorded and used to calculate the daily and monthly average of each capital.

To access the time of distribution of CCSF food services located in Rio Grande do Sul were visited and chosen for convenience. The data about distribution and time of replacement of the meals in the distribution were collected with the Food Safety and Quality team of the CCFS and visual inspections were carried out in the food services. In addition, parameters from the sanitary national legislation, RDC 216/2004, were used (Brazil, 2004).

2.2. Fitting data into distribution

The data were organized in Excel spreadsheets and were fitted into distributions, using the software @Risk (Palisade Corporation, version 7.5), by Monte Carlo simulation. This software was chosen as it provides the flexibility to analyze data in various formats.

To fit temperature data the data were tested for several distribution: Normal, Weibull, Triangular, Logistic, Pert, Beta General, Lognormal, Exponential and Uniform. For each meal, the different distributions were ranked according to the root mean squared error (RMSE) as a measure of goodness of fit. The distribution choices were done according to the study of Roccato, Uyttendaele, & Membre, 2017. Thus, the best fit distribution was provided by the lowest calculated RMSE value. All temperatures used to find the best distribution adjustment were those compiled from the real scenario according to the foods selected for this study.

To fit time data the Pert distribution was chose. Pert distribution was considered as the most appropriate distribution to fit the time data, since allowed to estimate completion time based on the best estimates of minimum, maximum and the most likely values for an event (Hazewinkel,1994).

2.3. Predictive growth of pathogens in cold meals submitted to different temperature scenarios

Based on the majority of non-conformities in distribution temperatures were observed in cold foods, different scenarios were developed for these foods and pathogen multiplication was predicted. *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* were chosen because both are important food pathogens worldwide. Further, *Salmonella* is the most involved microorganism in foodborne outbreaks in Brazil (Brasil, 2018) and *L. monocytogenes* is an important psychotrophic pathogen that grows in temperature of refrigeration (Azevedo et al. 2005; Mena et al., 2004).

The ComBase Predictor software was used to predict the behavior of both pathogens. It was selected the static growth models. The time of 6 hours was delimited, since it was the maximum distribution time observed in CCFS. In addition, it is the maximum time allowed by the Brazilian legislation for foods be distributed in food services (Brasil, 2004). Temperatures of 7, 10, 15, 21, 36.5 and 40 °C were used to *Salmonella* spp. and 1, 5, 10, 15, 21, 36.5 and 40 °C to *L. monocytogenes*, with an initial level of 1 log CFU/g. Minimum and maximum temperatures were chosen according to the limits preconized by ComBase Predictor to each microorganism.

The pH and water activity (a_w) values of the cauliflower, chickpeas, lettuce and pudding, were found in the literature (FDA, 2003; Nakaedo, Amaral, Penna, 2004; Barbosa-Cánovas et.al., 2007). The samples of beet, cabbage and carrot were subjected to analysis of pH using a benchtop pHmeter (Model Q400A, Quimis, Brazil) and water activity (a_w) using an AquaLab water activity meter (Model 3TE, Decagon Devices, USA). All pH and a_w values used in the ComBase were showed in Table 1.

Table 1: pH and water activity (a_w) of the evaluated cold meals.

Meals	pH	a_w	Source
Beet	5.7	0.986	(this study)
Cabbage	6.02	0.999	(this study)
Cauliflower	6.62	0.990	FDA, 2003; Barbosa-Cánovas et.al., 2007
Carrots	5.85	0.999	(this study)
Chickpeas	6.64	0.99	FDA, 2003; Gowan A., 2007
Lettuce	5.97	0.996	FDA, 2003; Barbosa-Cánovas et.al., 2007
Pudding	7.02	0.97	Nakaedo, Amaral, Penna, 2004; Barbosa-Cánovas et.al., 2007

The real scenario was based on the distribution temperature found in this study. The predictive secondary models were built using the square root equation described by Ratkowsky

et al. (1982) to describe μ as a function of storage temperature. The μ values were predicted by Combase in the previous situations described. The predicted growth of *Salmonella* and *L. monocytogenes* was calculated in @Risk, using the relationship between growth rate and the fitted distribution temperature. The growth of both pathogens during food distribution was calculated by multiplying predicted growth by the fitted time of distribution

2.4. Statistical analysis

The data were statistically analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 21.0, Chicago, IL). Descriptive (maximum, minimum, interquartile range and median) and non-parametric statistics (ANOVA and The Mann-Whitney test) were performed to see if a statistically significant difference existed between groups. For all statistical comparisons, a level of significance of 0.05 was used.

3. Results and Discussion

3.1 Temperature

3.1.1 Overall data

In the present study, 339.548 individual records of food distribution temperatures were analyzed. The CCFS were located in all Brazilian macro-regions, being possible to identify different scenarios of hot and cold meals at distribution. This is probably the most complete food distribution temperature survey carried out until now in Brazil.

From the survey, 226 data were excluded because they were outside of the range of 1 °C to 105 °C, being that 75 excluded temperature records were related to cold meals and 151 temperatures were related to hot meals.

3.1.2 Cold meals

It was analyzed 16.754 data of cold meals and the most distributed foods were beet, cabbage, cauliflower, carrots, chickpeas, lettuce and pudding. The temperature ranged from 1 °C to 38.3 °C, with mean numbers of 10.8 ± 4.8 °C. The lowest temperatures were observed in couliflower, while the higher temperature was observed in cabbage (Table 2).

Table 2: Temperatures of cold meals and fitted distribution in 337 restaurants of a Corporate Catering Food Service company of Brazil.

Meal	Temperature						Goodness of fitting criteria (RMSE)
	N	Minimum (°C)	Maximum (°C)	Median (IR) (°C)	Mean±SD (°C)	Fitting with @Risk	
Beet	2823	1	37	10 (7.5-14.8)	11.1±4.9	BetaGeneral	0.00162
Cabbage	2029	1	38.3	10.1 (7.3-14.6)	11±4.9	Triangular	0.00256
Cauliflower	128	1	20.6	11.4 (7.3-15.8)	11.3±5	BetaGeneral	0.00209
Carrots	2577	1	37	10 (7.1-14)	10.7±4.7	BetaGeneral	0.00154
Chickpeas	1201	1	32.3	10.2 (7.3-14.8)	11.3±4.9	BetaGeneral	0.00277
Lettuce	5294	1	29.8	10.6 (7.7-15.1)	11.4±4.9	BetaGeneral	0.00137
Pudding	2702	1	29.9	8.4 (6-11.4)	9±4.2	BetaGeneral	0.00152
Cooled	7094	1	37	9.3 (6.8-13.4)	10.2±4.75	Triangular	0.00228
Not cooled	9900	1	38.3	10.2 (7.4-14.2)	11.1±4.85	BetaGeneral	0.00147

IR: Interquartile Range

According to the Federal Brazilian Legislation, refrigerated foods prepared in food services should be distributed below 5 °C (Brasil, 2004). Our results demonstrated that only 11.1 % of all cold meals were below this temperature (Table 3). Only in the state of São Paulo, cold foods can be distributed in temperatures below 10 °C for up 4 hours, and from 10 °C to 21 °C, for the maximum of 2 hours (São Paulo, 2013). Taking into account the mean distribution temperature of all foods analyzed in this study, it was possible to conclude that the majority of the cold foods were distributed under inadequate temperatures except for the state of São Paulo.

The difficulty of obtaining temperatures below 5 °C during food distribution may be related to the lack of periodic maintenance of the equipment (Penedo, et al., 2015), the equipment capacity to refrigerate and difficulties to transfer temperature depending the kind of plates or vessels where foods are placed. Beyond that, foods like leafy greens present air among their leaves, making difficult cold transference.

Table 3: Scenarios of distribution cold temperatures of meals from 377 Corporate Catering Food Services.

Temperature Scenarios	Meal						
	Beet	Cabbage	Cauliflower	Carrot	Chickpeas	Lettuce	Pudding
<5°C	257 (9.1)	230 (11.3)	15 (11.7)	288 (11.2)	100 (8.3)	466 (8.8)	502 (18.6)
5.1°C – 10°C	1156 (40.9)	784 (5.1)	42 (32.8)	1046 (40.6)	493 (41)	2029 (38.3)	1326 (49.1)
10.1°C -15°C	770 (27.3)	559 (27.6)	37 (28.9)	723 (28.1)	320 (26.6)	1474 (27.8)	601 (22.2)
15.1°C - 21°C	604 (21.4)	425 (20.9)	34 (26.6)	497 (19.3)	265 (22.1)	1249 (23.6)	266 (9.8)
>21.1°C	36 (1.3)	31 (1.5)	0 (0.0)	23 (0.9)	23 (0.1)	76 (1.4)	7 (0.3)
Total	2823	2029	128	2577	1201	5294	2702

In the present study, different distribution temperature scenarios were identified. Temperature between 5 °C and 10 °C represented 41% of the preparations, between 10.1 °C and 15 °C represented 26.8 %, followed by 19.9 % between 15.1 °C and 21 °C. Only 1.2% of cold meals were distributed at temperatures higher than 21.1 °C. Considering the temperatures above 10 °C, 47.9 % of records demonstrated foods being distributed in temperatures that may allowed microbial growth (Table 3).

Similarly, to the results found in this study, Frantz et al. (2008) analyzed the temperature distribution records of fifteen industrial food services located in the Southern Brazil and found that only 14.3 % of cold meals were in adequacy with the national legislation (<5°C, Brasil 2004). Ricardo, Morais & Carvalho (2012) conducted a study in Goiânia city (State of Goiás, Midwest Brazil), evaluating 10 self-service food services, and found foods being

distributed in temperatures around 25°C, what is also in disagreement to the federal Brazilian regulation. The distribution of foods at low temperatures was also a difficulty in the Northern Spain where Garayoa et al. (2017) studied 15 catering services located in Navarra and demonstrated that only 33% of cold meals met the limit of <8 °C, with salads being the main dishes that exceeded this criterion.

Regarding the cold meals studied in the present work, it was observed significant differences in temperatures of different meals (ANOVA, $p < 0.001$). For example, the temperature of carrot was significantly different when comparing with lettuce, beet and chickpeas (0,00; 0.023; 0.031, respectively). The only meal that differs significantly from all other was the pudding (Figure 1), which demonstrated mean temperatures 2 °C lower than all other foods. This can be explained because normally this food is prepared a day in advance to be served, being refrigerated at least for 12 hours.

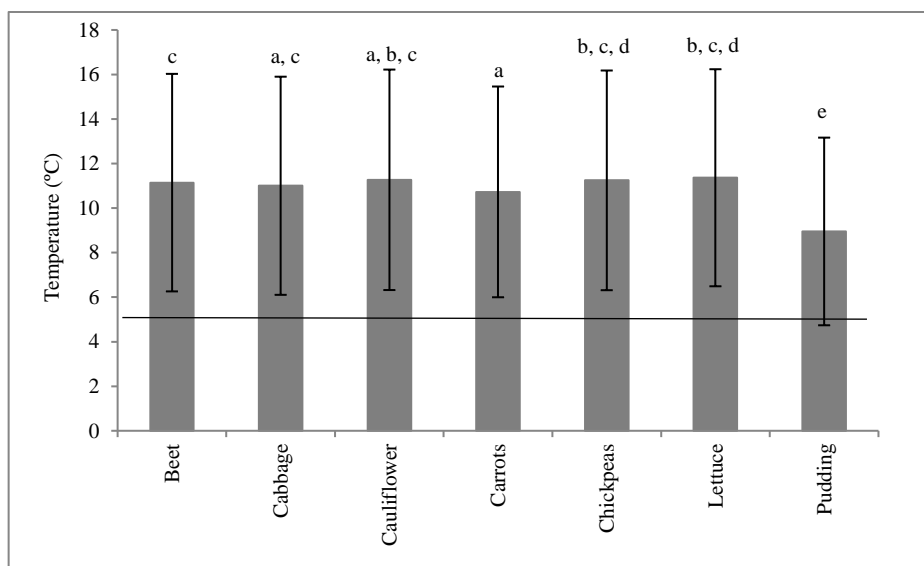


Figure 1: Temperatures of cold meals from 377 Corporate Catering Food Services of Brazil. Values are presented as the mean and standard deviation. Different letters in the same column represent a difference by Tukey's test ($p < 0.05$). Horizontal line represents the established limit according to the current legislation: <5 °C.

This study found an average temperature of 11.4 ± 4.9 °C for lettuces, with minimum of 1 °C and maximum of 29.8 °C (Table3). These temperatures were similar to other cold meals,

as beet, cauliflower and chickpeas (average of 11.1 ± 4.9 °C, 11.3 ± 4.9 °C and 11.2 ± 4.9 °C, respectively) (ANOVA, $p < 0.005$) (Figure 1). Other authors found higher temperatures for the same meals. For example, Penedo et al. (2015) found temperatures for leafy vegetables ranging from 9 °C to 19 °C, while higher temperatures were found by Ricardo et al. (2012) for lettuces i. e., 19 to 25 °C. Alves and Ueno (2010) found cauliflower and cabbage with temperatures from 10.1 °C a 21 °C and carrot, chickpeas and beet with distribution temperatures higher than 21 °C.

Rodriguez et al. (2011) suggested that inadequate temperatures of salads at distribution may be related to the usual practice to take off leafy greens from refrigerators and prepare salads at room temperature 3 - 4 hours before consumption, which could increase the temperature to 12-20 °C. Other reason for inadequate temperatures of food at distribution can be inadequate chilling after thermal processing. In Brazil foods should be chilled from 60 °C to 10 °C in 2 hours. After that, food should achieve <5 °C to be stored or distributed. The simple storage of food for few hours inside a common refrigerator, before distribution, may not be sufficient to achieve this chilling pattern, being important the use of other chilling strategies, such as the usage of freezers at -18 °C or a blast chiller. However, this equipment are not always available due to the lack of space inside kitchens or due to high costs.

With respect to environmental temperature, according to INMET, during the period of this research, average temperature showed that in the warmest month of sampling (March), the mean temperature was 27.9 °C in the Northeast macro-region and the coldest month (July) the temperature was 15.1 °C in the Southern macro-region (Table 4). In the coldest weather macro-region North (Palmas) showed higher temperatures (27.3 °C), lowest temperatures were observed in the Southern macro-region (Curitiba). The Southern macro-region presented for both periods evaluated average lower temperatures than the other macro-regions studied, with difference of 7.1 °C between the two periods. These were expected results, considering that the

southern macro-region is the coldest region of Brazil. However, for the northern macro-region the coldest period (July) had a higher temperature than the hottest period (March), with a difference of 1.3 ° C. These data demonstrated the climatic differences of these macro-regions and the climate differences in Brazil, which is a tropical country.

The temperature in the warmest month was higher than the coldest for all cities and months recorded, except for macro-region North. As expected, the statistical analysis showed that the mean food temperature in March was significantly higher than the mean temperature in July only in Southern and Southeast macro-regions.

Table 4: Environmental temperatures from different Brazilian region.

Macro-regions	State capitals	Temperature (°C)	
		March	July
South	Porto Alegre	23.2±2.1	14.4±2.4
	Florianópolis	23.4±1.6	16.9±1.9
	Curitiba	20±1.3	14.2±2.2
	Average	22.2±1.5	15.1±1.7
Southeast	Belo Horizonte	23.1±1.3	19±1
	São Paulo	21.7±1.2	16.7±2.6
	Rio de Janeiro	27±1.4	22.7±2.2
	Vitória	28.6±1.9	22.5±1.4
	Average	25.1±0.9	20.2±1.2
Midwest	Goiânia	22.8±1.4	19.9±1.4
	Cuiabá	25.2±1.3	22±2.8
	Campo Grande	23.8±1.2	19.5±3.4
	Average	23.9±0.8	20.4±1.6
Northeast	Maceió	27.6±1.1	24.9±1.2
	Salvador	28.4±1	24.7±0.9
	Aracaju	28.6±1.7	25.7±1.4
	João Pessoa	28±1.8	26±1.5
	Recife	28±1.3	25±1.3

	Natal	27.5±1.4	25.5±1.2
	Fortaleza	27.1±1.5	26.4±0.8
	Average	27.9±0.9	25.4±0.6
North	Manaus	25.9±0.9	27±1
	Palmas	25.7±1.5	27.3±1
	Average	25.8±1.2	27.1±1

The Southern macro-region was composed by the states Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná (these regions represent the coldest temperatures in Brazil), the environmental temperature was significantly lower than in Southeast macro-region (Table 4), and this characteristic may influence the distribution of food temperatures. In both macro-regions, there was a significant difference in distribution temperature for carrot, lettuce and beet, suggesting the influence of environmental temperatures in food temperatures at distribution.

Cooled food meals (beet, carrot, cauliflower, chickpeas and pudding) showed average of 1 °C lower temperatures than not cooled meals (lettuce and cabbage) (Figure 2), demonstrating the importance of the cooling process to decrease food temperature.

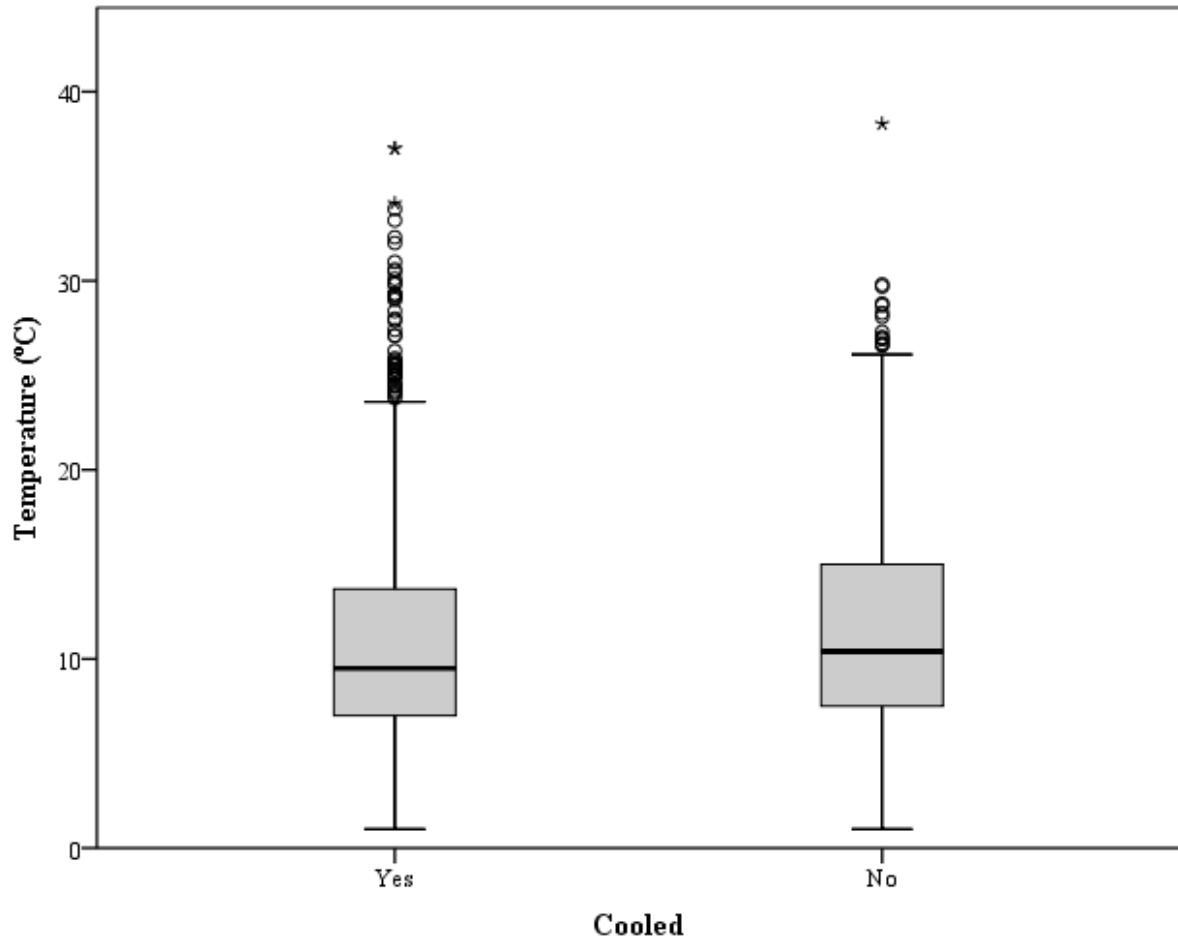


Figure 2: Boxplot of cooled and not cooled meals. The bottom and top of the box are the 25th and 75th percentiles (Q1 and Q3 respectively) and the band in the box is the median. The ends of the whiskers represent the lowest figure still within 1.5 IQR of the lower quartile and the highest figure still within 1.5 IQR of the upper quartile. The dots correspond to single data outlier points.

It is well recognized that low temperature is one of the most important factors to be controlled to preserve food quality and promote food safety, once it can reduce the microbial growth rates and preserve the sensorial characteristics of meals. Indeed, both pathogenic and spoilage organisms growth rates mainly depends on the temperature and time of storage (Derens-Bertheau, Osswald, Laguerre & Alvarez, 2015; Roccato, Uyttendaele, & Membré, 2017).

3.1.3 Hot meal

It was analyzed 34.060 temperature registers of hot meal at distribution and the most common meals distributed at buffets were beans, beef (cubes with sauce, meatballs, minced meat, roasted, steak), chicken (breaded, cubes with sauce, fried, gratin, grilled, roasted), pasta, pork and rice. The temperatures ranged from 29.5 °C to 105 °C, with an average of 78.3 ± 9 °C (Table 5).

Table 5. Temperatures of hot meals and fitted distribution in 337 restaurants of a Corporate Catering Food Service company of Brazil.

Meal	N	Temperature				Fitting with @Risk	Goodness of fitting criteria (RMSE)
		Minimum (°C)	Maximum (°C)	Median (IR) (°C)	Mean±SD (°C)		
Beans	10516	31.2	105	86.6 (80.3-91.4)	85.7±8.3	Triangular	0.00333
Beef							
Cubes with sauce	1089	50.4	103	79 (72.5+85.3)	79.1±8.7	BetaGeneral	0.00088
Meatballs	447	46.7	100	76.8 (71-82.4)	77.1±9.1	Triangular	0.002
Minced meat	609	55	103.1	79.1 (73.1-85.1)	79.4±8.2	BetaGeneral	0.00093
Roasted	918	54.4	100.1	78.3 (71.6-85.1)	78.5±9	BetaGeneral	0.00084
Steak	1787	47.1	104	76.3 (70.2-82.1)	76.8±9	Triangular	0.00294
Chicken							
Breaded	198	56.3	99.6	76.1 (69.3-81)	76.1±8.9	Triangular	0.00338
Cubes with sauce	612	57.1	103	78 (71-83.2)	77.9±8.9	BetaGeneral	0.00084
Fried	96	45	103	77.5 (71.5-83.3)	77.7±9.3	Triangular	0.00134
Gratin	332	54.5	101.5	79 (71.2-86.1)	78.5±10	BetaGeneral	0.00099
Grilled	2438	39	105	75 (69.6-81)	75.8±9.1	Triangular	0.0031
Roasted	603	37.2	105	77.8 (70.7-83.9)	77.9±9.4	Triangular	0.0031
Pasta	2009	29.5	100	74 (68.1-80.4)	74.8±9.6	Triangular	0.00456
Pork	1453	40	105	76.4 (70.4-81.6)	76.8±8.6	Triangular	0.00337
Rice	10953	33.2	105	82.4 (76.4-89.4)	82.5±9	Triangular	0.00377
Sauced	20777	31.2	105	79.8 (72.1 - 87)	79.60±9.7	BetaGeneral	0.00113

Not sauced	13267	29.5	105	84.6 (79 - 90.6)	84.17 ± 8.9	BetaGeneral	0.00099
------------	-------	------	-----	------------------	-------------	-------------	---------

IR: Interquartile Range

The mean temperatures of 99.5% of hot meal categories were in accordance with the Brazilian legislation (Table 5), which specifies that hot meals should be distributed in food services at or above 60 °C, for a maximum of 6 hours (Brasil, 2004; Rio Grande do Sul, 2009).

Other studies conducted in Brazil found lower mean hot distribution temperatures in comparison to this study. For example, Alves & Ueno (2010) analyzed samples of hot meals at distribution counters of 16 self-service food services of Taubaté city, São Paulo and found temperatures ranging from 33 °C to 71.2 °C. Momesso et al. (2005) analyzed 17 self-service food services in the city of Patos de Minas (Minas Gerais) and found only 20 % of hot meals with temperature above 60 °C. One possible explanation why in our study the mean temperatures were higher than the temperatures reported by Alves & Ueno (2010) and Momesso et al. (2010), is that CCFS analyzed by us carried out food safety audits each four-months, focusing on the control of temperatures. These audits are not usual in commercial Brazilian food services.

Even though the great majority of hot meals studied in the present study were distributed in adequate temperatures, the temperatures of different food types there were significantly differences among them (ANOVA, $p < 0.001$) (Figure 3).

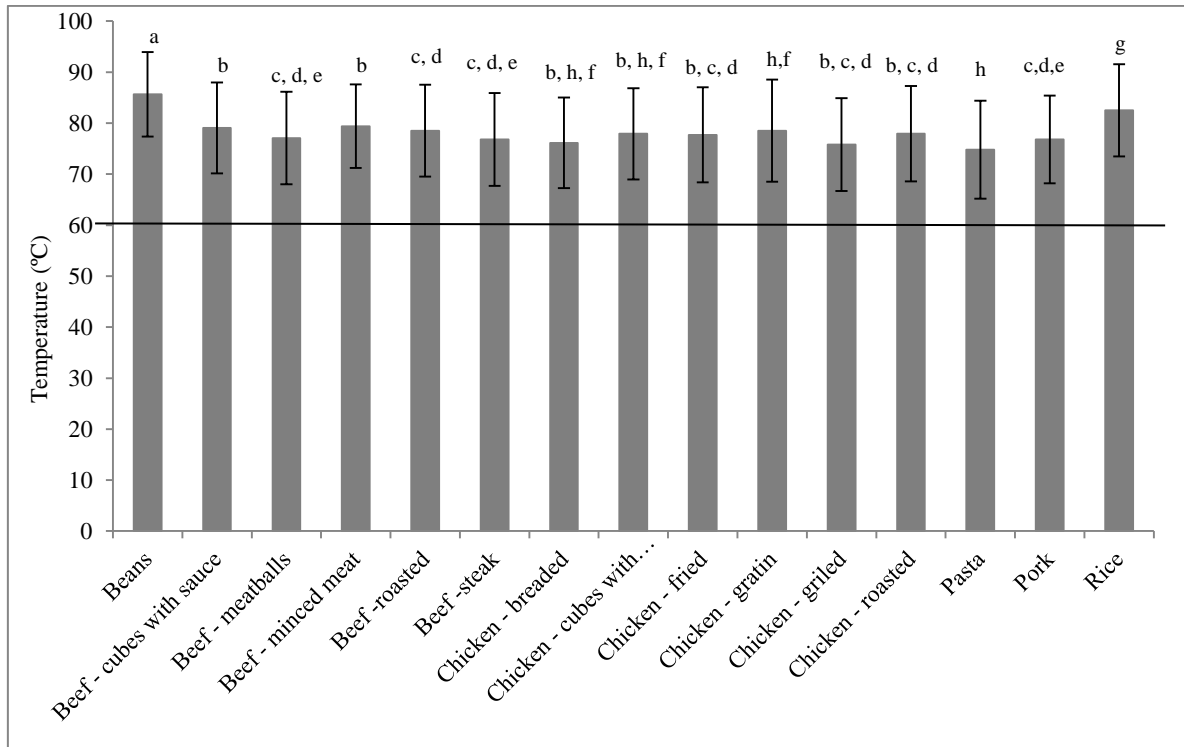


Figure 3: Temperatures of hot meal from 377 Corporate Catering Food Services. Values are presented as the mean and standard deviation. Different letters in the same column represent a difference by Tukey's test ($p < 0.05$). Horizontal line represents the established limit according to the current legislation: > 60 °C.

In this study, most meal temperatures analyzed showed similar distribution temperatures, despite of pasta, rice and beans differed statistically from all others and between them (Figure 3). The temperature observed for rice was 82.5 ± 9 °C, while chicken meals varied from 78.5 ± 10 °C (for grating) to 75.8 ± 9.1 °C (grilled). Beef temperatures ranging from 76.8 ± 9 °C (steak) to 78.5 ± 9 °C (roasted). These results corroborate with those found by Borges et. al. (2016) when analyzed hot meals of a university restaurant in city Palmas (Tocantins).

Statistical analysis showed that the average food temperature in March (summertime) was higher than the average temperature in July (wintertime) in Southeast macro-region, following the similar behavior of the environmental temperature, that in March the temperature was higher in 4.9 °C compared to the month of July in the same macro-region. (Table 4).

In this research it was found significant differences in temperature distribution of most hot meals in the five macro-regions of Brazil (ANOVA, $p < 0.001$). Food prepared with sauce

(beans, minced meat, beef cubes with sauce, meatballs, chicken cubes with sauce and pork) showed an average of 4.6 °C higher than foods without sauce (rice, pasta, beef, steak and roasted), chicken (breaded, grilled, au gratin, roasted and fried), being this difference significant according the Mann-Whitney test ($p < 0.05$) (Figure 4). This fact can be explained by the better heat conductivity of foods presenting higher liquid content and or prepared in water (Ruocco, Almeida & Lopes, 2006).

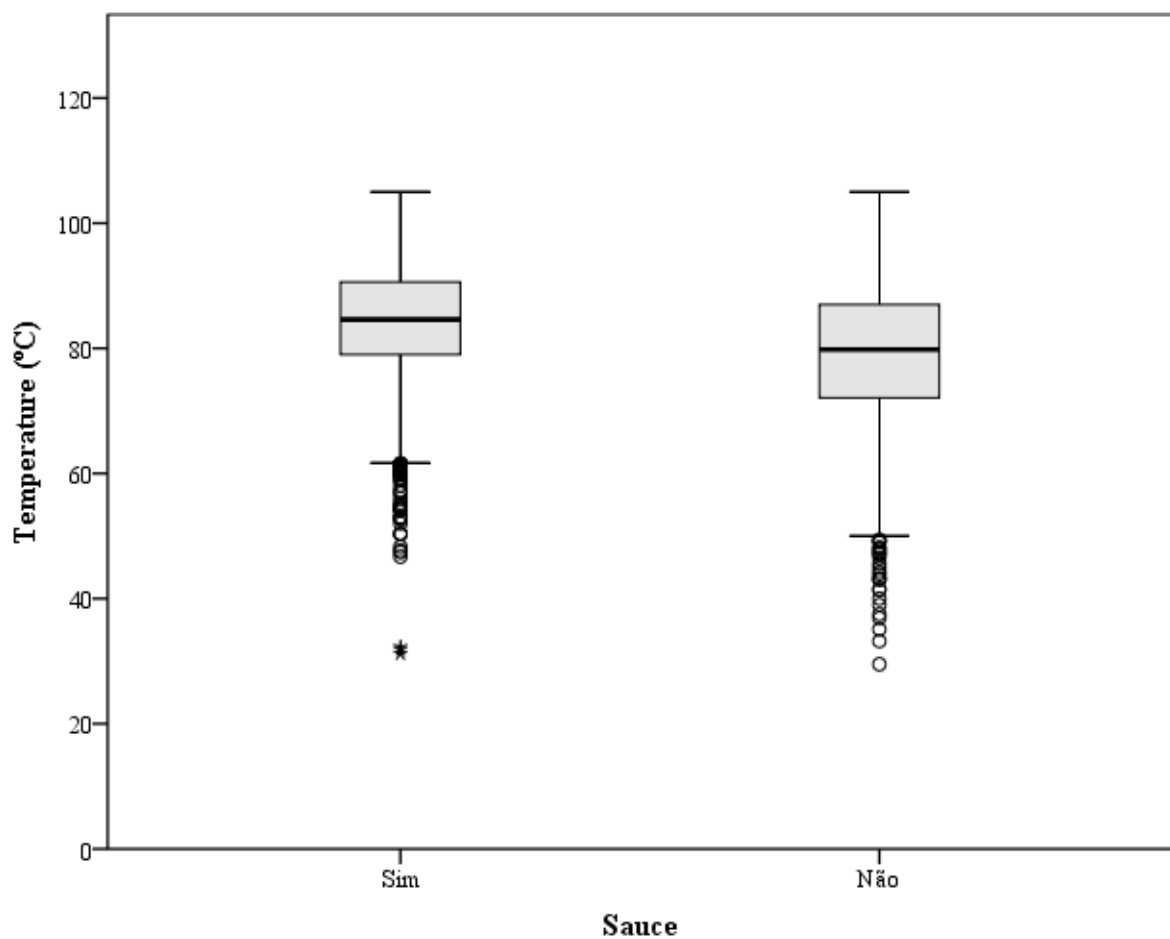


Figure 4: Boxplot of sauced and not sauced meals. The bottom and top of the box are the 25th and 75th percentiles (Q1 and Q3 respectively) and the band in the box is the median. The ends of the whiskers represent the lowest figure still within 1.5 IQR of the lower quartile and the highest figure still within 1.5 IQR of the upper quartile. The dots correspond to single data outlier points.

It was found a significant difference in food temperature distribution between food services, comparing hot and cold meals. Likewise, similar results were found by other authors (Ricardo, Morais & Carvalho, 2012; Penedo et al., 2015).

3.2 Fitting data for cold and hot meal and time of distribution

For temperature distribution of cold meals Beta General was the most appropriate distribution to fit data from beet, cauliflower, carrots, chickpeas, lettuce and pudding, while the Triangular distribution was the most appropriate to fitting data for cabbage and cooled meals (Table 2). On the other hand, for hot meals Triangular and Beta General distribution were the most appropriate to describe temperature data of these meals (Table 5). The root mean square error (RMSE) values were close to zero in these distributions presented, demonstrating a good result for the temperature variability. Gogou, Katsaros, Derens, Alvarez and Taoukis (2015) have developed a database containing a large number of time-temperature profiles of different parts of the cold food chain. The same study used a probabilistic tool to perform simulation scenarios of the evolution of time-temperature along the cold chain. The Triangular distribution was also chosen by Roccató, Uyttendaele, & Membré, (2017) with data obtained from the study of Azevedo et al., (2005), when analyzing refrigerator temperatures in Portugal.

In relation to time spent during distribution, according to observations and to data obtained with the CCSF, normally, from 11 AM to 12 AM the customer flow at the restaurants was low and from 12 AM to 1 PM, due to the business lunch time, the peak of customer flow occurs. Thus, the repositions of each meal depend, first, on the flow of clients and, secondly, on the size of the containers where the meals were placed. Therefore, it is possible to design three scenarios for cold meal in relation to the time of distribution in CCSF: 1) The meal was exposed at distribution and consumed in less than 0.5 hour, considering a meal placed in small containers and at peak hour of customer flow; 2) The meal was distributed in 2 hours; 3) The

worst-case scenario: the meal was distributed up to 6 hours, considering a meal exposed before initiate lunch time (10 AM) in a big and deep container, not much consumed by clients and replaced in the end of service (4 PM). Finally, data fitting showed the time distribution as (Pert 0, 2 and 6h).

Temperature and time of food distribution should be considered in CCFS, since different scenarios may lead to different microbial growth. In these establishments, normally, these kind of information is set as singles point 'worst-cases', which is a conservative approach and may overestimates the likelihood of exposure to unacceptable numbers of pathogenic microorganisms (Adams & Moss, 2008; Roccató, Uyttendaele, & Membré, 2017). However, these data analysis enable important decision-making since the use of data distributions makes it possible to observe the variability of temperature and time parameters influencing microbial numbers and its probability of occurrence (Membré & Valdramidis, 2016; Membré & Guillou, 2016).

3.3 Fitting data for time distribution

Besides temperature, distribution time is an important variable determinant in microbial growth. In these CCSF studied the flow of customers were intense, which may not occur in places with lower flow of service, being these patterns represented by the Pert distribution developed in our research.

3.4. Scenario of cold meals

Different scenarios were assessed to evaluate the growth of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* on vegetables, leguminous and desserts consumed in CCFS (Table 6 and 7). The scenarios of hot meals were not analyzed because 99.5% of these preparations were adequate i.e. were above 60 °C and foodborne microorganism do not grow or even survive at these temperatures.

As shown in Table 1, the pH values and water activity (a_w) of the food studied were in the range (5.7–7.02) and (0.97-0.999), respectively. These values were used to predicted the growth of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* on cold meals using Combase Predictor (<https://browser.combase.cc/>).

Table 6 showed the estimated growth of *Salmonella* at different temperatures and at the real scenario - based on the fitted distribution temperature found in this study. In the models predicted by ComBase Predictor software, *Salmonella* did not grow on foods at 7 °C during 6 hours - the maximum period allowed by Brazilian legislation for distribution of foods. Several factors, such as the food, the strain used, and the presence of inhibitors, may influence the growth of *Salmonella* at low temperatures. Matches and Liston (1968) reported that *Salmonella* spp. were able to grow at temperatures from 5.3 to 46.2 °C. However, Lanciotti et al. (2001) found *Salmonella* Enteritidis growing at 4.69 °C. In addition, results showed that all cold meals presented an exponential growth at 36.5 °C (the optimum temperature of *Salmonella* growth) and decline slightly at 40 °C. Considering the real scenario found in this study the estimated bacterial growth on cold foods were between 0.02 and 1.06 log CFU/g.

Table 6: Estimated growth of *Salmonella* (Log CFU/g) calculated by ComBase Predictor Software considering different temperature scenarios.

Foods	Temperature °C						Real Scenario
	7	10	15	21	36.5	40	
Beet	0	0.01	0.03	0.21	2.62	2.47	0.90
Cabbage	0	0.01	0.04	0.04	3.75	3.54	0.39
Cauliflower	0	0.01	0.04	0.38	3.47	3.23	0.11
Carrots	0	0.01	0.04	0.36	3.6	3.41	1.06
Chickpeas	0	0.01	0.04	0.38	3.47	3.23	0.29
Lettuce	0	0.01	0.04	0.43	3.93	3.71	0.46
Pudding	0	0	0.02	0.09	1.18	1.05	0.02

The growth potential (δ) of a microorganism on foods is a measure which allow to define the difference between the final population of a given organism in the final validity of a determined food and its initial population. When δ values were negative or lower than 0.5 log CFU/g, it is considered that microorganism is not able to grow on this food (Uyttendaele et al., 2009, Álvarez-Ordóñez et al., 2015). ComBase Predictor software demonstrated that bacterial growth at 10, 15 and 21 °C during 6 hours was between 0 and 0.43 log CFU/g, being, consequently, considered insignificant because δ was lower than 0.5 log CFU/g. Sant'Ana et al. (2012) also used δ to evaluate the microbial growth on vegetables at 7 °C for 6 days and demonstrated similar results of us, because δ for green salad was 0.46 and for spinach was 0.13. In other study, δ for *Salmonella* on Iceberg lettuce was 0.23, while on Iceberg lettuce was 0.34, after 24 h at 10 °C (Patel and Sharma 2010). It is worth mentioning that even our worst scenario of distribution (maximum 6 hours and all foods at 21 °C) demonstrated a predicted δ lower than 0.5 log CFU/g.

Predicted growth of *Salmonella* on lettuces at 36.5 °C demonstrated the highest multiplication, reaching 3.93 log CFU/g, while considering the real scenario the growth was 0.46 log CFU/g. Carrot was the food with the highest multiplication in the real scenario, i.e. 1.06 log CFU/g, while in the predicted model at 36.5 °C the growth was 3.6 log CFU/g. Beets and carrots were the only cold meals that sustain growth higher than 0.5 log CFU/g in the real scenarios (Table 6).

Considering that *Salmonella* spp. multiplies in a range from 5.3 to 46.2 °C - optimum growth between 35 °C and 37 °C (Matches and Liston, 1968), distribution temperatures should be controlled, since at abusive temperatures of 36.5 °C the growth of this microorganism on food could increase its population up to 3 log CFU/g.

The infectivity of *Salmonella* is highly variable (Mintz et al., 1994; Musher and Musher, 2004) and can reach 6 Log CFU/g (Little et al., 2007; Oliveira et al., 2010), depending on several

combinations as age and health of the individual, food, and of the *Salmonella* strain (Forsythe, 2013). Humphrey T. J. (2004) reported low infective dose in cheese (1 Log CFU/g), peanut butter (1 to 2 Log CFU/g) and chocolate (<2 Log CFU/g). In the real scenario the predictive growth of *Salmonella* on cold meals were similar to those reported results, being between <1 Log CFU/g. Thus, the predictive growth for the cold meals studied were below the infective dose of 6 Log CFU/g.

Table 7 showed the estimated growth of *L. monocytogenes* in different temperatures and at the real scenario retrieved in this research. In the found in this study (real scenario), the estimated growth of cold meals was between 0.05 and 2.09 log CFU/g. In the models predicted, *L. monocytogenes* did not grow on foods studied at temperatures of 1 and 5 °C and at temperatures of 10 to 15°C showed growths between 0.01 and 0.03 log CFU/g, after 6 hours. All those growths potentials were considered insignificant because the δ was lower than 0.5 log CFU/g.

Table 7: Estimated growth of *L. monocytogenes* calculated by ComBase Predictor Software considering different temperatures.

Foods	Temperature °C							Real Scenario
	(Log CFU/g)							
	1	5	10	15	21	36.5	40	
Beet	0	0	0.01	0.02	0.07	0.53	0.47	1.97
Cabbage	0	0	0.01	0.02	0.1	0.87	0.77	0.75
Cauliflower	0	0	0.01	0.03	0.19	1.48	1.34	0.54
Carrots	0	0	0.01	0.02	0.08	0.65	0.57	2.09
Chickpeas	0	0	0.01	0.03	0.19	1.48	1.34	2.02
Lettuce	0	0	0.01	0.03	0.12	1.03	0.93	0.05
Pudding	0	0	0.01	0.02	0.07	0.56	0.49	1.16

L. monocytogenes is a microorganism that survives in cooling temperatures (Azevedo et al., 2005; Duret et al., 2014) and multiplies between 0 and 42 °C (Forsythe, 2013). In the model predicted by ComBase Predictor software at 21 °C during 6 hours the growth of *Listeria* was between 0.07 and 0.19 log CFU/g, also considered insignificant based on δ . For temperature of 36.5 °C, the growth was between 0.53 and 1.48 log CFU/g, however for temperature of 40 °C the multiplication decreased. Considering the real scenario, all foods studied had a multiplication above 0.5 log CFU/g, excepting lettuces which showed the significant growth potential only above 36.5 °C.

L. monocytogenes is a foodborne pathogen of worldwide concern due to the high mortality rate. Lokerse et al. (2016) conducted a study to verify ingredients that may contribute to the growth of *L. monocytogenes* in vegetable salads. Through the ingredients used an evaluation was made to detect the growth capacity of *L. monocytogenes*. The highest count was 3.4 log CFU/g in the melon and potato used to compose the salad. In white cabbage, the presence of lactic acid bacteria has effect competitive flora on growth inhibition of *L. monocytogenes*. This may explain the low cabbage growth rate (0.01 log CFU/g in temperature 21 °C) in the predictive model (Table 7) since intrinsic factors as pH, a_w and inhibitory compounds can prevent the multiplication of *L. monocytogenes* in foods (i.e. $\text{pH} \leq 4.4$ and $a_w \leq 0.92$) (Forsythe, 2013; Álvarez-Ordóñez et al., 2015). Other research showed carrots holding inhibitory compounds effective against *L. monocytogenes* in the research of Noriega et al. (2010). Thus, in our study this cold meal showed the highest *L. monocytogenes* growth among the food analyzed.

4. Conclusion

In the present study, food temperature records distributed in Brazilian 337 CCFS were evaluated. This is probably the largest survey of food distribution temperatures carried out in

Brazil. The observed scenarios demonstrated the difficulty faced by CCFS in reaching and maintaining cold food temperatures, which was not observed for the hot preparations since the majority of them was distributed in adequate temperatures (>60 °C). Warm external temperatures can significantly influence the distribution temperatures of cold meals. To observe the variability of time and temperature parameters data fitting showed Beta General (cold meals), Triangular (hot meals) and Pert (time) distributions as the most appropriate.

At the temperatures below 10 °C, according to the predictive model, all cold foods did not sustain significant multiplication for *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*. So, this result suggests that at these temperatures the multiplication of these pathogens could be controlled. In addition, these temperatures could be suggested as safe to distribution of foods in periods shorter than in 6 hours in CCSFS. Another viable alternative to prevent microbial multiplication in different distribution scenarios would be to control the time distribution of these meals.

Acknowledgments

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

5. References

Adams, M. R., & Moss, M. O. (2008). *Food microbiology*. (3th ed.). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

Álvarez-Ordóñez, A. Leong, D., Hickey, B., Beaufort, A., Jordan, K. (2015). The challenge of challenge testing to monitor *Listeria Monocytogenes* growth on ready-to-eat foods in Europe by following the European Commission (2014) Technical Guidance document. *Food Research International*, 75. 233-243.

Alves, M. G. & Ueno, M. (2010). Restaurantes self-service: segurança e qualidade sanitária dos alimentos servidos. *Revista de Nutrição*, 23, 573-80.

Angelo, K. M., Nisler, A. L., Hall, A. J., Brown, L. G. (2017). Epidemiology of restaurant-associated foodborne disease outbreaks, United States, 1998–2013. *Epidemiology and Infection*. 145, 523-534.

Associação Brasileira de Refeições Coletivas (ABERC). (2015). Avançam as ações do PAACE. *Boletim Notícias*, 23 (144), 1-4.

Associação Brasileira de Refeições Coletivas (ABERC). (2018). Mercado Real. <http://www.aberc.com.br/mercadoreal.asp?IDMenu=21>. Accessed: 13 July 2018.

Azevedo I., Regalo M., Mena C., Almeida G., Carneiro L., Teixeira P., Hogg T., Gibbs P. A. (2005). Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. *Food Control*, 16, 121 - 124.

Banati, D., & Lakner, Z. (2012). Managerial attitudes, acceptance and efficiency of HACCP systems in Hungarian catering. *Food Control*, 25, 484 - 492.

Barbosa-Cánovas G. V., Fontana A. J., Jr., Schmidt S. J., Labuza T. P. Water Activity in Foods. Fundamentals and Applications. (2007) <http://www.amac.md/Biblioteca/data/30/14/10/60.2.pdf>. Accessed: 13 July 2018.

Borges, N. R., Moura, B. A., Vieira, C. F. S., Santos, D. D. M., Almeida, L. J., Zuniga, A. D. G. (2016). Avaliação do binômio tempo-temperatura das refeições de um restaurante na cidade de Palmas– Tocantins. *Revista Desafios*, 03, 90-98.

Brasil (2001). Resolução RDC no. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, DF: Diário Oficial da União.

Brasil (2004). Resolução RDC no. 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. Brasília, DF: Diário Oficial da União.

Brasil (2018). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Brasília, DF.

Buccheri, C., Mammina, C., Giammanco, S., Giammanco, M., Guardia, M., & Casuccio, A. (2010). Knowledge, attitudes and self-reported practices of food service staff in nursing homes and long-term care facilities. *Food Control*, 21, 1367-1373.

Brugalli, A., Pinto, J. M. & Tondo, E. C. (2002) Análise de perigos e pontos críticos de controle para garantir a segurança alimentar em restaurante da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. *Higiene Alimentar*, 16, 15-19.

CAC (Codex Alimentarius Commission) (1999). Principles and guidelines for the conduct of a microbiological risk assessment. CAC/GL-30. Joint FAO/WHO Food Standards: Programme.

Capalonga, R., Ramos, R.C., Both, J. M. C., Soeiro, M. L. T., Longaray, S. M. M, Haas, S., Tondo, E. C. (2014). *Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8, 811-817.

Carneiro, M. R. P., Cabello, P., Albuquerque-Junior, H., Cavalcanti, R. L. Jain, S. & Candido, A. L. (2015). Characterization of a foodborne outbreak caused by *Salmonella* Enteritidis in Aracaju, State of Sergipe, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48, 334-337.

Center for Disease Control (CDC). (2016) Multistate outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to beef products produced by adams

farm (final update). <https://www.cdc.gov/ecoli/2016/o157h7-09-16/index.html>> Accessed in 16 November 2017.

Chesca, A. C., Caetano, A.M., Leite, A. P. C., Polveiro, A.M., Terra, A. D. & Lyra, F. S. (2001). Avaliação das temperaturas de pistas frias e quentes em restaurantes da cidade de Uberaba, MG. *Higiene Alimentar*, 15, 38-43.

Costalunga, S. & Tondo, E. C. (2002). Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 342–346.

Center of Science in the Public Interest (CSPI). (2016). Outbreak Alert! 2001-2010. A Review of Foodborne Illness in America. http://cspinet.org/new/pdf/outbreak_alert_2013_final.pdf. Accessed 16 November 2017.

Cunha, D. T., Saccol, A. L. F., Tondo, E. C., de Oliveira, A. B., Ginani, V. C., Araújo, C. V., Lima, T. A. S., de Castro, A. K. F. & Stedefeldt, E. (2016). Inspection Score and Grading System for Food Services in Brazil: the results of a food safety strategy to reduce the risk of foodborne diseases during the 2014 FIFA World Cup. *Frontiers in Microbiology*, 27, 1-10.

Cummins, E. (2016). Quantifying microbial propagation. In J. M. Membre, & V. Valdramidis (Eds.), *In modeling in food microbiology. From predictive microbiology to exposure assessment* (pp. 17–31). ISTE Press Ltd and Elsevier Ltd.

Derens-Bertheau, E., Osswald, V., Laguerre, O., & Alvarez, G. (2015). Cold chain of chilled food in France. *International Journal of Refrigeration*, 52, 161–167.

Duret, S., Guillier, L., Hoang, H. M., Flick, D., Laguerre, O. (2014). Identification of significant parameters in food safety by global sensitivity analysis and accept/reject algorithm: application to the ham cold chain. *International Journal of Food Microbiology*, 180, 39-48.

European Food Safety Authority (EFSA). (2015). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13,3991 - 4156.

Forsythe S. J. (2013). *Microbiologia da Segurança dos Alimentos*. (2th ed) São Paulo: Artmed.

Food and Drug Administration. Approximate pH of foods and food products. 2003. http://www.webpal.org/SAFE/aaarecovery/2_food_storage/Processing/lacf-phs.htm. Accessed in 25 July 2018.

Frantz, C. B., Bender, B., Oliveira, A. B. A., & Tondo, E. C. (2008). Avaliação de Registros de Processos de Quinze Unidades de Alimentação e Nutrição. *Brazilian Journal of Food and Nutrition*, 19, 167-175.

Garayoa, R., Díez-Leturia, M., Bes-Rastrollo, M., García-Jalón, I., & Vitas, A. I. (2014). Catering services and HACCP: Temperature assessment and surface hygiene control before and after audits and a specific training session. *Food Control*, 43, 193-198.

Gogou, E., Katsaros, G., Derens, E., Alvarez, G., & Taoukis, P. S. (2015). Cold chain database development and application as a tool for the cold chain management and food quality evaluation. *International Journal of Refrigeration*, 25, 109–121.

Gomes-Neves, E., Araújo, A. C., Ramos, E., & Cardoso, C. S. (2007). Food handling: Comparative analysis of general knowledge and practice in three relevant groups in Portugal. *Food Control*, 18, 707-712.

Hazewinkel, M. (1994) Probability distribution. In. **Hazewinkel, M.** (Ed.) *Encyclopedia of Mathematics*.Netherlands:Springer Science+Business Media B.V. / Kluwer Academic Publishers.

Humphrey, T.J. (2004). *Salmonella*, stress responses and food safety. *Nature Reviews Microbiology*, 2,504–509.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (2015). *Microrganismos em alimentos 8: utilização de dados para avaliação do controle de processo e aceitação do produto*. São Paulo: Blucher.

James, S. J., Evans, J., & James, C. (2008). A review of the performance of domestic refrigerators. *Journal of Food Engineering*, 87, 2–10.

Juneja, V. K., Marks, H. M., & Mohr, T. (2003). Predictive Thermal Inactivation Model for Effects of Temperature, Sodium Lactate, NaCl, and Sodium Pyrophosphate on *Salmonella* Serotypes in Ground Beef. *Applied and environmental microbiology*, 69, 5138–5156.

Juneja, V. K., Melendres, M. V., LHuang, L., Gumudavelli, V., Subbiahc, J. Thippareddi, H. (2007) Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken. *Food Microbiology*, 24, 328–335.

Little, C. L., Taylor, F. C., Sagoo, S. K., Gillespie, I. A., Grant, K., McLauchlin, J. (2007). Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetable salads in the UK. *Food Microbiology*, 24, 711–717.

Kusumaningrum, H. D., Van Asselt, E. D., Beumer, R. R., Zwietering, M. H. (2004). A Quantitative Analysis of Cross-Contamination of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. Via Domestic Kitchen Surfaces. *Journal of Food Protection*, 67, 1892–1903.

Lanciotti R., Sinigaglia M., Gardini F., Vannini L., Guerzoni M.E. (2001). Growth/no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis in model

systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration. *Food Microbiology*, 18, 659–668.

Loiko, M. R., de Paula, C. M. D., Langone, A. C. J., Rodrigues, R. Q., Cibulski, S., Rodrigues, R. O., Camargo, A. C., Nero, L. A., Mayer, F.Q., Tondo, E. C. (2016). Genotypic and antimicrobial characterization of pathogenic bacteria at different stages of cattle slaughtering in southern Brazil. *Meat Science*, 116, 193-200.

Lokerse, R. F. A., Maslowska-Corker, K. A., Van de Wardt, L. C., Wijtzes T. (2016). Growth capacity of *Listeria monocytogenes* in ingredients of ready-to eat salads. *Food Control*, 60, 338-345.

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

Membré, J. M., & Guillou, S. (2016). Latest developments in foodborne pathogen risk assessment. *Current Opinion in Food Science*, 8, 120–126.

Membré, J. M., & Valdramidis, V. (2016). Modeling in food microbiology. From predictive microbiology to exposure assessment. UK: ISTE Press Ltd and Elsevier Ltd.

Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., & Gibbs, P. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialised in Portugal. *Food Microbiology*, 21, 213– 216.

Mintz, E. D., Cartter, M. L., Hadler, J. L., Wassell, J. T., Zingeser, J. A., Tauxe, R. V., 1994. Dose – response effects in an outbreak of *Salmonella* Enteritidis. *Epidemiology and Infection*. 112, 13–23.

Momesso A. P., Matté M. H. & Germano P. M. L. (2005). Avaliação das condições higiênico-sanitárias, por quilo, do município de São Paulo, durante o período de distribuição de refeições.

Higiene Alimentar, 19, 81-89.

Monteiro, M. A. M., Ribeiro, R. C., Fernandes, B. D. A., Sousa, J. F. R. & Santos. L. M. (2014).

Controle das temperaturas de armazenamento e de distribuição de alimentos em restaurantes comerciais de uma instituição pública de ensino. *Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde*, 9, 99 -106.

Musher, D. M., Musher, B. L. (2004). Contagious acute gastrointestinal infections. *The New England Journal of Medicine*. 351, 2417–2427.

Nikaedo P. H. L., Amaral F. F., Penna A. L. B. (2004). Caracterização tecnológica de sobremesas lácteas achocolatadas cremosas elaboradas com concentrado protéico de soro e misturas de gomas carragena e guar. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40, 397 - 404.

Noriega, E., Newman, J., Sagers, E., Robertson, J., Laca, A., Díaz, M., Brocklehurst, T.F. (2010). Antilisterial activity of carrots: effect of temperature and properties of different carrot fractions. *Food Research International*, 43, 2425–2431.

Oliveira, M. A., Abeid Ribeiro, E. G., Morato Bergamini, A. M., Pereira de Martinis, E. C., 2010. Quantification of *Listeria monocytogenes* in minimally processed leafy vegetables using a combined method based on enrichment and 16S rRNA realtime PCR. *Food Microbiology* 27, 19–23.

Onyeneho, S. N. & Hedberg, C. W. (2013). An Assessment of Food Safety Needs of Restaurants in Owerri, Imo State, Nigeria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 3296-3309.

Oscar, T. P. (2011). Plenary lecture: Innovative modeling approaches applicable to risk assessments. *Food Microbiology*, 28, 777-781.

Patel, J., Sharma, M. (2010). Differences in attachment of *Salmonella* enterica serovars to cabbage and lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*. 139, 41-47.

Penedo, A. O., de Jesus, R. B., Silva, S. C. F., Monteiro, M. A. M. & Ribeiro, R. C. (2015). Avaliação das temperaturas dos alimentos durante o preparo e distribuição em restaurantes comerciais de Belo Horizonte - MG. *Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde*, 10, 429 – 440.

Ricardo, F. O., Morais, M. P. & Carvalho, A. C. M. S. (2012). Controle de tempo e temperatura na produção de refeições de restaurantes comerciais na cidade de Goiânia-GO. *Demetra: Nutrição e Saúde*, 7, 85-96.

Rio Grande do Sul (2009). Secretaria da Saúde. Portaria n. 78, de 30 jan. Aprova a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprova Normas para Cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e dá outras providências. Porto Alegre, RS.

Ristori, C. A., Rowlands, R. E. G., Martins, C. G., Barbosa, M. L., Dos Santos, L. F., Jakabi, M. & de Melo Franco B. D. G. (2017) Assessment of consumer exposure to *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat products at retail in the city of São Paulo, Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14, 447-453.

Ritter, A. C. & Tondo, E. C. (2014) Foodborne illnesses in Brazil: control measures for 2014 FIFA World Cup travellers. *The Journal Of Infection In Developing Countries*, 8, 254-257.

Roccatto, A., Uyttendaele, M. & Membré, J. M. (2017). Analysis of domestic refrigerator temperatures and home storage time distributions for shelf-life studies and food safety risk assessment. *Food Research International*, 96, 171–181.

Rodriguez, M., Valero, A., Posada-Izquierdo, G. D., Carrasco, E., & Zurera, G. (2011). Evaluation of food handler practices and microbiological status of ready-to-eat foods in long-term care facilities in the Andalusia region of Spain. *Journal of Food Protection*, 74, 1504-1512.

Rosset, P., Cornu, M., Noel, V., Morelli, E. & Poumeyrol, G. (2004). Time–temperature profiles of chilled ready-to-eat foods in school catering and probabilistic analysis of *Listeria monocytogenes* growth. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 49–59.

Ruocco, M. A. C, Almeida, F. Q. A. & Lopes, C. R. M. (2006). Monitoramento da Temperatura de Preparações Quentes e Frias em um Serviço Técnico de Nutrição e Dietética. *Nutrição em pauta*, 14, 43-46.

São Paulo. (2013). Secretaria da Saúde. Centro de Vigilância Sanitária. *Portaria CVS 5, de 09 de abril de 2013. Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação*. São Paulo, SP.

Saccol, A. L., Setrafim, A. L., Hecktheuer, L. H. R., Medeiros, L. B., Spinelli, M. G. N., Abreu, E. S., Chaud, D. M. A. (2013). Hygiene and sanitary conditions in self-service restaurants in São Paulo, Brazil. *Food Control*, 33, 301-305.

Sant'Ana, A. S., Barbosa M. S., Destro M. T., Landgraf, M., Franco, B. D. G. M. (2012). Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 52–58.

Schaffner, D. W., Brown, L. G., Ripley, D., Reimann, D., Koktavy, N., Blade, H., & Nicholas, D. (2015). Quantitative Data Analysis to Determine Best Food Cooling Practices in U.S. Restaurants. *Journal of Food Protection*, 78, 778–783.

Selman, C. & J. Guzewich. (2013). Environmental assessment in outbreak investigations. In Y. Motarjemi, G. Moy, and E. Todd (Eds.), *Encyclopedia of food safety* (pp. 98–106). Waltham: Academic Press.

Silva Júnior, E. A. (2014). *Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação* (7th Ed.) São Paulo: Varela.

Stephan, R., Althaus, D., Kiefer, S., Lehner, A., Hatz, C., Schmutz, C., Jost, M., Gerber, N., Baumgartner, A., Hachler, H. & Mausezahl-Feuz, M. (2015). Foodborne transmission of *Listeria monocytogenes* via ready-to-eat salad: A nationwide outbreak in Switzerland, 2013–2014. *Food Control*, 57, 14–17.

Tondo, E. & Bartz, S. (2014). *Microbiologia e sistemas de gestão da segurança dos alimentos*. Porto Alegre: Sulina.

Tondo, E. C., Casarin, L. S., Oliveira, A. B., Martello, L., Silva Jr., E. A. S. & Dilma Gelli, D. (2015). Avanços da segurança de alimentos no Brasil. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, 3, 122–130.

Tondo, E.C. & Ritter, A. C. (2012). *Salmonella and Salmonellosis in Southern Brazil: a review of the last decade*. Nova Science Publishers.

Trindade, D. N., Leal, C. M. A., Vieira, M. F. A. & Almeida, A. T. S. (2009). Monitoramento da Temperatura de Distribuição de Preparações Quentes em Uma Unidade de Alimentação e

Nutrição na Cidade de Rio Grande. In: *Anais do 11. Encontro de Pós-Graduação - I Mostra Científica 2009*. Pelotas: UFPEL, 1-4 16.

Uyttendaele, M., Busschaert, P., Valero, A., Geeraerd, A. H., Vermeulen, A., Jacxsens, L., Goh, K. K., De Loy, A., Van Impe, J. F., Devlieghere, F. (2009). Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. *International Journal of Food Microbiology*. 133, 94–104

Ventimiglia, A, T. M. & Basso, O. C. (2008). Tempo e temperatura na distribuição de preparações em Unidade de Alimentação e Nutrição. *Disciplinarium Scientia*, 9, 109-114.

Warriner, K. & Namvar, A., (2009). What is the hysteria with Listeria? *Trends in Food Science and Technology*, 20, 245–254.

Zwietering, M. H. (2015). Risk assessment and risk management for safe foods: assessment needs inclusion of variability and uncertainty, management needs discrete decisions. *International Journal of Food Microbiology*, 213, 118-123.

Zwietering, M. H. Besten, H. M. W. D. (2011). Modeling: One word for many activities and uses. *Food Microbiology*, 28, 818-822.

5.2 Artigo Científico 2

Assessing the contamination of vegetable choppers and subsequent kinetic growth of *Salmonella* spp. on cooked beet artificially contaminated

ABSTRACT

Cooked beets have been involved with salmonellosis and the vegetable choppers have been identified as one of the most likely sources of contamination. The present study aimed to evaluate the natural microbiological contamination of vegetable choppers and evaluate kinetic growth parameters of *Salmonella* in cooked beets artificially contaminated. Vegetable choppers from 23 industrial kitchens were analyzed to assess their natural contamination. Then, the kinetic growth of *Salmonella* was predicted on artificially cooked beet at 7, 10, 20, 30 and 38 °C, and compared with ComBase. Choppers demonstrated total mesophilic microorganisms and *Enterobacteriaceae* ranging from not detected to $> 10^4$ CFU/cm² and 8.70% of them showed the presence of *Salmonella*. Simulations using @Risk showed *Salmonella* distribution prevalence of 4% to 25%, which could result in 44 kg to 278 kg of beets contaminated daily. The primary predictive model showed that at 7 and 10 °C *Salmonella* growth was less than 1 log CFU/g in 117 and 30 hours, respectively. The secondary predictive model showed R² of 0.97 and RMSE of 0.005, demonstrating the model as adequate to predict the growth of *Salmonella* in cooked beet under temperature from 7 to 38°C. The results indicate that vegetable choppers of industrial kitchens could be contaminated with foodborne pathogens, such as *Salmonella*, also, time and temperature should be controlled at the distribution of cooked beet. The results obtained are useful for food services industries as safe parameters for time and temperature distribution of cooked beet: 6 hours at maximum 10°C.

1. Introduction

Currently, foodborne diseases are a growing global problem of public health. Foodborne outbreaks occur after the ingestion of contaminated food or water, and may be caused by several microorganisms, their toxins or by chemicals (Forsythe, 2013; Souza, 2008).

In Brazil, the official report of the Secretary of Health Surveillance shows that 42.6 % of the reported foodborne outbreaks of the period from 2000 to 2017 occurred in food services and the *Salmonella* was reported as the main microorganism involved in foodborne outbreaks in this period (BRASIL, 2018). For this type of segment foodborne outbreaks represent one of the worst situations that may occur, since industrial food services has provided 12 million meals a day, has dealt with 18.2 billion dollars and has offered 210 thousand direct jobs (ABERC, 2018). Thus, the occurrence of a foodborne outbreak implicates in great social and economic losses for this sector.

Cunha (2008) reported that in the years of 2000 to 2002 cross-contamination due to poor hygiene of equipment and utensils were the third leading cause of general foodborne outbreaks that occurred in food services in Rio Grande do Sul State, Brazil. According to Food Safety Program (2012) equipments and other food contact surfaces may provide opportunities for cross-contamination. Improper washing and sanitation of equipments and utensils could lead to contamination of the vegetables by bacteria.

Vegetable choppers are one of the most used equipments inside food services and are one of the most difficult to clean. The non-hygienic design of some choppers may contribute to the accumulation of waste and formation of biofilms (Oliveira et al 2007). In addition, these equipments have been used to cut vegetables and other foods, sometimes even perishable products as ham and cheese.

Based on these facts, the present study aimed to evaluate the natural microbiological contamination of vegetable choppers used in food services, as well as to evaluate kinetic growth parameters of *Salmonella* spp. in cooked beets artificially contaminated.

2. Materials and Methods

2.1 Chopper contamination

Industrial kitchens (n=23) located in Rio Grande do Sul State (Brazil) were visited and one vegetables chopper per establishment was evaluated (n=23). These industrial kitchens produced together approximately 18.500 meals daily, the volume of produced meals ranged from 200 to 5.450 meals/day and the majority (n=15) producing an average of 300 meals/day. All industrial kitchens had Good Hygiene Practices Manual, Sanitarian Standard Operational Procedures (SSOP) implemented and a nutritionist as professional responsible for controlling production and food safety procedures.

2.2 Microbiological analysis

The surface of vegetable chopper blades was analyzed using swab technique described by the American Public Health Association (APHA, 2015). The swab was applied with pressure on the vegetable chopper blades so that all the cotton surface comes into contact with the sample. Afterwards, the tubes with swabs were sent to the Laboratory of Microbiology of Food ICTA/UFRGS. In the Laboratory, each 10 ml glass tube containing each swab was shaken in vortex for 10 seconds, and then subjected to two decimal dilutions in 0.1% peptone saline solution. For the total count of aerobic mesophilic microorganisms, 0.1mL of each decimal dilution were spreaded in duplicate Plate Count Agar (PCA) (Merck, Darmstadt, Germany) and the plates were incubated inverted in a bacteriological incubator at 37°C, for 48h. The counts of *Enterobacteriaceae* and thermotolerant coliforms were performed spreading 0.1mL of each

decimal dilution in duplicate on Crystal Violet Neutral Red Bile Agar (VRBA) (Merck, Darmstadt, Germany) and the plates were incubated inverted in a bacteriological incubator at 37°C for 48h. The confirmation of thermotolerant coliforms was carried out inoculating typical colonies isolated on VRBA into glass tubes containing EC broth (Merck, Darmstadt, Germany) and incubating them in water-bath at 45°C. The presence of *Salmonella* spp. was performed by adding 5mL of 0.1% peptone saline solution containing the swabs in 45mL of 1% buffered peptone saline solution, and incubating that for 24h in a bacteriological incubator at 37°C. After incubation, 1mL of the bacterial suspension was transferred to the Selenite-Cystine broth (Acumedia, São Paulo, Brasil) and incubated at 37°C for 18 hours and 0.1mL to the Rappaport-Vassiliadis broth (Merck, Darmstadt, Germany) was incubated at 41,5°C for 18 hours. After that, a loopfull from each broth was spread on Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD) (HiMedia, Mumbai, India) and Brilliant Green Agar Base (BPLS) (Merck, Darmstadt, Germany), and typical *Salmonella* colonies were searched after an overnight incubation at 37°C. Typical colonies of *Salmonella* spp. were subjected to biochemical tests according to the Normative Instruction N. 62 (BRASIL, 2003).

2.3 Modeling the growth of *Salmonella* on cooked beet

2.3.1 Beet

Beets were cooked, peeled and cut using a non-contaminated chopper and samples of 10g were placed inside identified sterile plastic bags.

2.3.2 Pathogens inoculation on beet

In order to evaluate *Salmonella* growth on beets a pool of six *Salmonella* strains were composed of the following strains: *Salmonella* Enteritidis SE86, *Salmonella* Typhimurium L12031, *Salmonella* Typhimurium 1T2, *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Newport and

Salmonella Saint Paul. All the strains came from the culture collection of the Laboratory Food Microbiology and Food Control (ICTA/UFRGS). The *Salmonella* strains were grown separately in 5mL of BHI (Merck, Darmstadt, Germany), at 37°C for 24h. The cultures were centrifuged, separately, at 4°C, for 10 min, at 2810g. Supernatants were discharged and pellets were washed with 0.1% peptone water. This procedure was repeated 3 times. Then cells were re-suspended with 0.1% peptone water and all *Salmonella* strains were mixed in the pool, reaching final cell concentration of 10^8 CFU/mL, confirmed by plating on XLD (HiMedia, Mumbai, India) and PCA (Kasvi, Paraná, Brasil). Decimal serial dilutions were prepared using 0.1% peptone water. The cooked beet already packed in sterile bags was artificially contaminated with the *Salmonella* pool, reaching a final cells concentration of 3 log CFU/g. After that, the bags were homogenized for 1min using a stomacher (Stomacher 400 Circulator Seward, United Kingdom) and stored at 7, 10, 20, 30, and 38°C in different periods. *Salmonella* counts were performed according to Elias, Noronha & Tondo (2018). The predictive primary model described by Baranyi and Roberts (1994) was used to calculate the kinetic growth parameters. The growth curves for each temperature were built by fitting the experimental data to the Baranyi's DMFit version 2.1 Excel® (add-in www.ifr.ac.uk/safety/DMfit). The following parameters were obtained: 1) maximum growth rate (μ); 2) lag time (λ) and 3) maximum population density. The predictive secondary model was built using the square root models described by Ratkowsky et al. (1982) to describe μ as a function of storage temperature. Measures of determination coefficient (R^2) were used to evaluate the performance of the models built in this study. The R^2 was generally considered as an overall measure of the prediction calculated by developed model, and the closer to 1 the better the model's performance (Wang et al., 2013).

The root mean square error (RMSE) was used in this study and indicates the best possibility fit between predictive and observed values, and the closer to 0 the better models

performance. (Oh et al., 2012; Wang et al., 2013). In addition, intrinsic parameters of cooked beet (pH of 5.7 and a_w of 0.986) were inserted in ComBase Predictor for further comparisons data of this study.

2.4 Statistical Analysis

Data were inserted in Microsoft® Office Excel® 2013 and ANOVA test followed by Tukey test was performed for statistical comparisons a level of significance of 0.05 was used. The distributions of prevalence, considering the uncertainties and the probability of contamination were simulated using the program @Risk student version 7.5.

3 Results and Discussion

3.1 Natural contamination of vegetable choppers

Total mesophilic microorganisms of chopper blades ranged from not detected (ND) to 4.22 log CFU/cm², with a mean number of 3.16 log CFU/cm². Only two (8.7%) choppers showed counts higher than 4 log CFU/cm², and 13 (56.5%) of them showed less than 1 log CFU/cm². *Enterobacteriaceae* counts ranged from ND to 4.06 log CFU/cm², with a mean numbers of 1.06 log CFU/cm². Only one chopper presented counts higher than 4 log CFU/cm², and in nine (39.1%) choppers *Enterobacteriaceae* was not found. The differences in the counts of total mesophilic microorganisms and *Enterobacteriaceae* were not statistically significant.

Similar results were also demonstrated by other studies analyzing vegetable choppers (Kochanski et al. 2009; Coelho et al., 2010). Diverse microbiota is involved in the adhesion processes of equipment used in food production. This microbiota may include Gram-positive and Gram-negative bacteria, spore-forming or non-spore-forming microorganisms, rods, coccus, psychrotrophic, mesophilic, thermophilic and heat-resistant microorganisms (Andrade, 2008).

Currently, in Brazil there is no legislation setting out microbiological standards for surfaces that are in contact with food. For this reason, international criteria are often used as references (Silva Júnior., 2008). For example, the American Public Health Association (APHA, 2015) defines that the count of total mesophilic microorganisms should be less or equal to 2 CFU/cm².

No choppers showed contamination by thermotolerant coliforms, however two (8.70%) of them showed the presence of *Salmonella* spp. *Salmonella* distribution of this prevalence was simulated using the @Risk program, considering the sampling uncertainties. Simulation results showed a prevalence distribution of 4% to 25% with an average of 13%.

According to the company where choppers were sampled, the consumption of beets was 1,110 kg/day and each client consumed 60 g/day of cooked beet. Thus, considering the minimum and maximum *Salmonella* prevalence simulated by @Risk, the *Salmonella* contamination of beets by contaminated choppers could vary from 44 kg to 278 kg/day, respectively, with a mean of 144 kg/day.

This information is important because *Salmonella* has been reported as the main etiological agent of foodborne illnesses in Brazil (BRASIL, 2018), and also in Rio Grande do Sul State (Tondo et al., 2015), where the sampling was carried out. Corroborating to these facts, Murmann et al. (2008) described one salmonellosis outbreak related to cooked beets occurred in Rio Grande do Sul State. Some of the probable contamination sources suggested by these authors were the chopper contamination, improper hand hygiene of food handlers, the difficulty in refrigerating large amounts of cooked beet before chopping, the improper storage temperature of chopped beets before serving and the long time of distribution.

3.2 Growth parameters of *Salmonella* pool on cooked beet

To built mathematics models is necessary to use a higher initial population between 10^3 and 10^4 CFU/g (Koseki and Isobe, 2005; Ding et al., 2010). In this study, it was used an initial concentration of *Salmonella* pool of 3 log CFU/g demonstrated lag phases of 117, 30, 5, 2 and 1 h, at temperatures of 7, 10, 20, 30 and 38 °C, respectively. The final concentration was 8 log CFU/g after 11 h at 38 °C. Other values were presented in Table 1. According to some authors some foods, such as vegetables, are naturally-contaminated with 10^1 and 10^2 CFU/g of *Salmonella* (Cordano and Jacquet, 2009; Oliveira et al., 2010; Sant’Ana et al., 2011).

Table 1. Kinetic growth parameters of *Salmonella* spp. on cooked beet according to microbiological counts and ComBase Predictor Models at different temperatures.

Growth parameters	Model	Temperature (°C)				
		7	10	20	30	38
μ_{\max}	Cooked Beet <i>Salmonella</i> pool	0.006 ± 0.00155	0.055 ± 0.010	0.212 ± 0.018	0.508 ± 0.037	0.631 ± 0.085
λ		117.038 ± 161.315	30.22 ± 8.95	5.243 ± 1.644	2.193 ± 0.494	1.088 ± 0.742
FP		8.749 ± 1.154	8.387 ± 0.102	8.758 ± 0.096	8.083 ± 0.066	8.12 ± 0.13
μ_{\max}	ComBase	0.011	0.023	0.177	0.537	0.673
λ		149.57	67.40	8.95	2.94	2.33
FP		8.48	8.48	8.48	8.48	8.48

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

The Table 1 data presents primary growth parameters (growth rate, lag time, and maximum final population) of *Salmonella* pool on cooked beet and Combase Predictor at different temperatures. All growth curves started with an initial population of approximately 3.0 – 3.3 log CFU/g of *Salmonella* and reached final populations varying between 8.12 ± 0.13 and 8.758 ± 0.09 log CFU/g. The lag phases were smaller on cooked beet than in ComBase predictions, and this can be explained by ComBase considering growth of *Salmonella* in broth cultures, while our data was generated measuring the growth of *Salmonella* on real cooked beet. It could be observed that the exponential growth rates increased with higher temperature and

the opposite occurred with lag phases, because as higher the temperature, lower were the lag times. As expected, the highest lag times (h) were observed at 7 and 10 °C and this result corroborates to our previous results, reporting that in low temperatures the multiplication of *Salmonella* was controlled. Similar results were found by Veys et al. (2016), when artificially contaminated lettuce with *Salmonella* pool were submitted to a temperature of 10 °C for 24 hours and microbial multiplication was not observed.

ComBase demonstrated longer μ_{\max} when compared to the microbial results of our study at temperatures of 7, 30 and 38°C. However, at 10 and 20°C ComBase predicted lower μ_{\max} (0.023; 0.177, respectively) than the results found by us (0.055; 0.212, respectively).

Figure 1 demonstrates the fitting of experimental data to the Baranyi model at different temperature used in this study and the moment the final population of *Salmonella* pool was reached. At 7 °C a final population of 10^8 CFU/g was observed after 31 days; at 10 °C the maximum density of cells was reached at 8 days; at 20 °C in 42 hours; at 30 °C in 14 hours and 38 °C after 11 hours. Elias et al. (2016) found similar results at temperatures of 10, 15, 20, 25, 30 and 37 °C, when analyzed homemade mayonnaise samples artificially contaminated with *Salmonella* Enteritidis SE86. According to our results, at 38°C, *Salmonella* took 6 hours to reach 10^6 CFU/g; at 30°C, it took 8 hours; at 20°C, 25 hours; at 10°C, 3.1 days; and at 7 °C, 17.2 days.

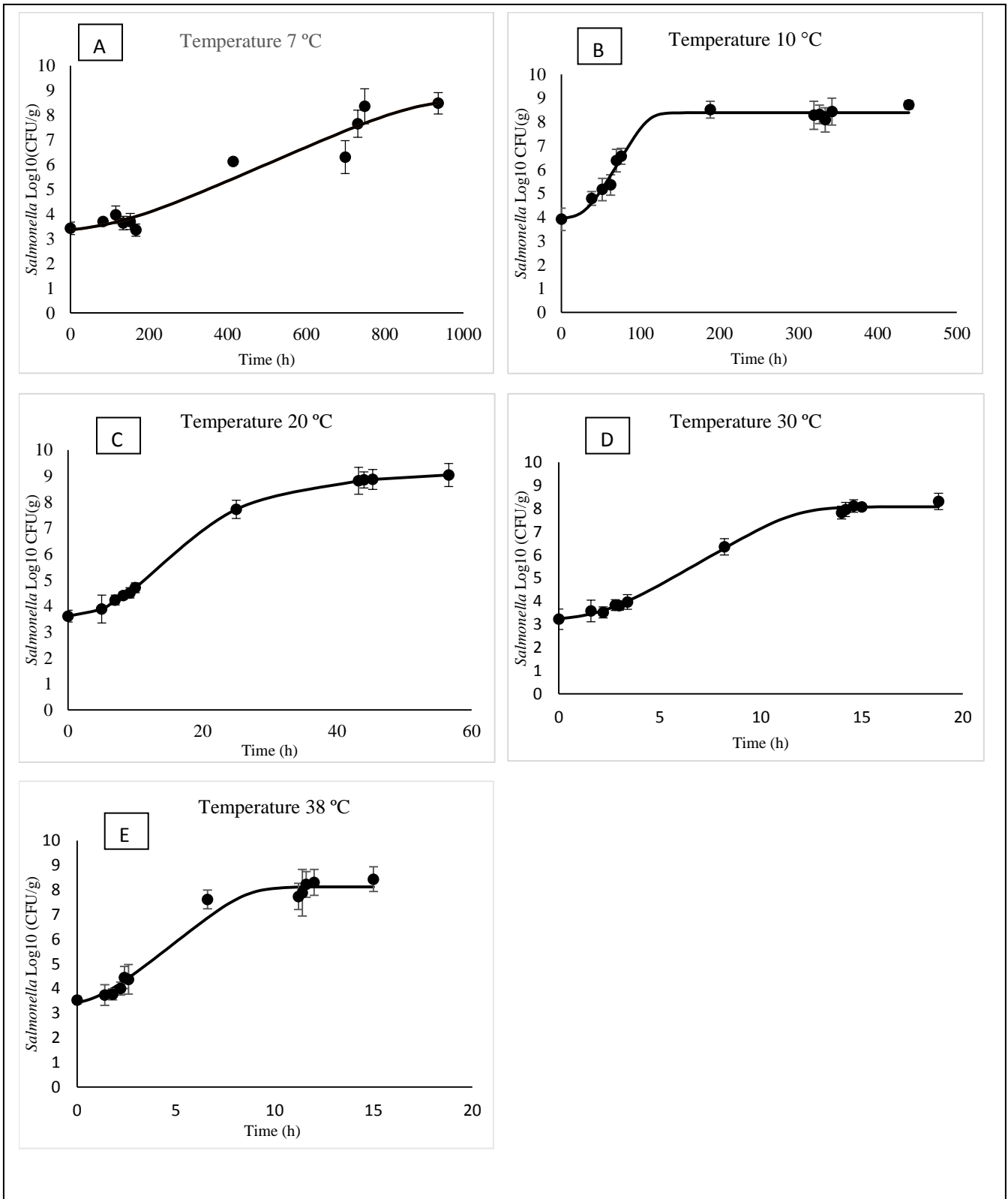


Figure 1. Growth of *Salmonella* in cooked beet stored at 7 °C (A), 10 °C (B), 20 °C (C), 30 °C (D), 38 °C(E), fitting data to Baranyi DMFit add-in version 2.1 (www.ifr.ac.uk/safety/DMfit). Each point represents a mean of triplicate results.

The R^2 for growth curves (primary models) of *Salmonella* pool on cooked beet were higher than 0.97. These results indicate that a good fit occurred between the experimental data and the primary model, considering that the regression line approximated the real data.

Results of secondary model presented in Table 2 were drawn based on the data (maximum growth rate) obtained in primary models. Secondary model allowed the prediction of the parameters (growth rate) described on the basis of the temperature variation.

Table 2. Secondary model represented by square root equation to predict growth rate as a function of temperature of *Salmonella* pool in cooked beet.

	Secondary Model	R^2	RMSE
Cooked Beet	$\sqrt{\mu} = 0.0228(T-0.956)$	0.9739	0.005
ComBase	$\sqrt{\mu} = 0.0252(T-0.0732)$	0.9837	0.001

μ : growth rate (log CFU/g/h); R^2 : coefficient of determination; $RMSE$: root mean square error; T : temperature ($^{\circ}C$).

The coefficient of determination (R^2) of our results was 0.97, confirming the precision of our model. The goodness-of-fit of a predictive model is usually characterized by the Root Mean Square Error (RMSE). In our model, the RMSE value was 0.005. Based on these results and the R^2 obtained (0.97), our model is proper for modeling the growth of *Salmonella* pool in cooked beet in different temperature conditions varying from 7 to 38 $^{\circ}C$.

In a Corporate Catering Food Services cooked beet is prepared in the day of serving or a day before. When prepared on the day, the worst scenario of time and temperature which allows microbial growth, the chopped cooked beet after remains 5 hours at room temperature. Our results showed that in these conditions *Salmonella* would reach 3.8 log CFU/g at 20 $^{\circ}C$ and 4.8 log CFU/g at 30 $^{\circ}C$ (both temperatures could be easily achieved inside kitchens). On the other hand, if cooked beet is stored under refrigeration (7 $^{\circ}C$), in 5 hours, *Salmonella* would grow only 0.3 log CFU/g, while at 10 $^{\circ}C$ would grow 0.9 log CFU/g.

If the beet is cooked and chilled the day before for 12h to 24h and stored under refrigeration at a temperature of 7 °C, *Salmonella* will reach 0.3 log CFU/g in 12 hours and 0.4 log CFU/g in 24 hours. According to Sant'Ana, Franco & Schaffner (2014), in order to reduce the risk of infection by *Salmonella*, it would be necessary to keep lower than 5 °C, to avoid this pathogen to reach an infective dose of 10⁶ CFU/g (Little et al., 2007; Oliveira et al., 2010). However, the results of this study showed that, at 7 and 10°C the multiplication of the microorganism did not reach 1 log CFU/g. These results may be useful for Corporate Catering Food Services to control the temperature conditions in the distribution of cooked beets and to ensure the quality of the food served to the customers.

4. Conclusion

Considering real scenarios, room temperature inside industrial kitchens can be very high, also failures in cooling and controlling temperature during preparations may cause multiplication of *Salmonella*. However, if stored at a temperature of 7 and 10 °C, even if prepared the day before, the population will not increase higher than 1 log CFU/g. Therefore, to ensure the quality of the product and to avoid the risk of contamination it would be necessary to maintain these foods refrigerated and adopt the complete procedure of choppers disinfection. The results obtained in our research are useful to be adopted by food services as safe parameters for time and temperature distribution of cooked beet: 6 hours at maximum 10 °C.

Acknowledgments

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

5. References

- ABERC - Associação Brasileira de Empresas de Refeições Coletivas (2018)
<http://www.aberc.com.br/mercadoreal.asp?IDMenu=21>. Accessed 12 July 2018
- Andrade, NJ (2008) Higiene na Indústria de Alimentos. Varela, São Paulo
- APHA (2015) Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods. American Public Health Association, Washington DC
- Baranyi J, Roberts TA (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J. Food Microbiol.* 23: 277-294
- BRASIL (2003) Ministério de Defesa, Agropecuária, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de. Accessed 12 July 2018
- BRASIL (2018) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Dados Epidemiológicos – DTA período 2000 - 2017. Accessed 12 April 2018
- Coelho, AIM. et al. (2010) Contaminação microbiológica de ambientes e de superfícies em restaurantes comerciais. *Cienc Saude Coletiva* 15:1597-1606
- Cordano, AM, Jacquet, C (2009) *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: prevalence and strain characterization. *Int J. Food Microbiol* 132: 176-179
- Cunha, B (2008). Investigação de Surtos Alimentares ocorridos em Serviços de Alimentação no Rio Grande Do Sul. Trabalho de conclusão de curso de Graduação – Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Ding, T, Jin, YG, Oh, DH (2010) Predictive model for growth of *Listeria monocytogenes* in untreated and treated lettuce with alkaline electrolyzed water. *World J Microbiol Biot* 26:863-869

Elias, et al (2016) Modeling Growth Kinetic Parameters of Salmonella Enteritidis SE86 on Homemade Mayonnaise Under Isothermal and Nonisothermal Conditions. *Foodborne Path Dis.* 13:472-467

Elias, SO, Noronha, TB, Tondo, EC (2018) Assessment of Salmonella spp. and Escherichia coli O157:H7 growth on lettuce exposed to isothermal and non-isothermal conditions. *Food Microbiol* 72: 206-213

Food Safety Program. Cross-contamination. (2012) FACT SHEET #7. Accessed 14 October 2018

Forsythe, SJ (2013) *The microbiology of safe food*. 2nd ed. Wiley-Blackwell. United Kingdom

Kochanski, S et al. (2009) Avaliação das Condições Microbiológicas de uma Unidade de Alimentação e Nutrição. *Aliment Nut, Araraquara* 20:4

Koseki, S, Isobe, S (2005) Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. *Int J Food Microbiol* 104:239-248

Little, CL, et al (2007) Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetable salads in the UK. *Food Microbiol* 24:711-717

Oh, DH, Ding, T, Jin, YG (2012) A new secondary model developed for growth rate of *Escherichia coli* O157:H7 in broth. *Indian J Microbiol* 52:99-101

Oliveira, ABA et al (2010) Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão, Porto Alegre, RS. *Revista HCPA* 30: 279-285

- Oliveira, K. et al (2007) Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to Stainless Steel Surfaces. *Braz J Microbiol* 38:318-323
- Ratkowsky, DA, Olley, J, Mcmeekin, TA, Ball, A (1982) Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J Bacteriol* 149:1-5
- Sant'Ana, AS, Landgraf, M, Destro, MT, Franco, BDGM (2011) Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in Sao Paulo, Brazil. *Food Microbiol* 28: 1235-1237
- Sant'Ana, AS, Franco, BDGM., Schaffner, DW (2014) Risk of infection with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* due to consumption of ready-to-eat leafy vegetables in Brazil. *Food Control* 42:1-8
- Silva Júnior, EA (2014) Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação. Varela, São Paulo
- Souza, CP (2008) The Impact of Food Manufacturing Practices on Foodborne Diseases. *Braz Arch Biol Techn*, 51:815-823
- Tondo, EC, Ritter, AC Sopeña, LC (2015) Involvement in Foodborne Outbreaks, Risk Factors and Options to Control *Salmonella* Enteritidis SE86: An Important Food Pathogen in Southern Brazil. In: *Salmonella* Prevalence, Risk Factors and Treatment Options. Bacteriology Research Developments. Nova Science Publishers, New York. pp. 65-75
- Veys, O, Elias, SO, Sampers, I, Tondo, EC (2016) Modelling the growth of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157 on lettuce. *Procedia Food Sci* 7: 168 – 172
- Wang HY, Wen CF, Chiu YH, Lee IN, Kao HY (2013) *Leuconostoc Mesenteroides* Growth in Food Products: Prediction and Sensitivity Analysis by Adaptive-Network-Based Fuzzy Inference Systems. *PLoS ONE* 8:1-16

5.3 Artigo Científico 3

Predictive models for growth of *Salmonella* spp. in cooked carrots and raw cabbage

Elis Regina Gomes Alfama^{a*}, Claudia Titze Hessel^a, Susana de Oliveira Elias^a, Valquíria Constancio Batista^a, Eduardo Cesar Tondo^a

^aLaboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, CEP. 91.501-970 Porto Alegre/RS, Brasil.

* Corresponding author: elisregina.ictaufrgs@gmail.com

ABSTRACT

This study developed predictive models to describe the behavior of *Salmonella* spp. growth on cooked carrots and raw cabbage exposed to different temperatures. A pool of 6 *Salmonella* spp. strains was inoculated on cooked carrots and raw cabbage, separately, and samples were stored at 7, 10, 20, 30 and 38 °C. The growth data were fitted to the Baranyi model in order to calculate lag phase, exponential growth rate and final population achieved. The growth parameters were fitted to secondary models as function of storage temperature. The lag phase was 441 and 29 hours on cooked carrots exposed to 7 and 10 °C, respectively. *Salmonella* did not grow on raw cabbage at 7 and 10 °C. The final population ranged between 7.32 and 8.51 log CFU/g on cooked carrot and 6.38 - 7.44 log CFU/g on raw cabbage in temperatures evaluated. The coefficient of determination of secondary model for cooked carrots was 0.98 and for raw cabbage was 0.92. The root mean square error was 0.003 and 0.036 for cooked carrots and raw cabbage, respectively. Based on these data, the developed mathematical models can be used to adequately describe the behavior of *Salmonella* as function of temperatures from 7 to 38 °C on cooked carrots and from 20 to 38 °C on raw cabbage. In practical terms, the growth

of *Salmonella* on these vegetables could be controlled by ensuring that these products are distributed under temperatures below 10 °C during distribution in food services.

Keywords: predictive modeling; time and temperature binomial; vegetables.

Highlights

- *Salmonella* spp. was able to grow on cooked carrots at 10 °C after 29 h.
- Secondary model was able to predict the growth of *Salmonella* spp. at 7 to 38 °C on cooked carrots.
- Secondary model was able to predict the growth of *Salmonella* spp. at 20 to 38 °C on raw cabbage.
- There is no multiplication of *Salmonella* pool on raw cabbage at 7 and 10 °C.

1 Introduction

The consumption of fresh products has increased during the last years worldwide, mainly due to consumer awareness of the importance of these products for their health and the low price of meals (Pollack, 2001; Slavin & Lloyd, 2012; PBH, 2015). Among the most fruits and vegetables consumed in commercial restaurants and in corporate catering food services (CCFS) are carrot and green cabbage (Alfama 2018, submitted; Kothe, 2017). However, the number of registered foodborne diseases involving these products is raising in many countries as well (Sivapalasingam et al., 2004; Anonymous, 2008, 2010; Brasil, 2018; EFSA, 2013).

Salmonella spp. strains have been responsible for several foodborne outbreaks associated with fresh products (Olaimat and Holley 2012; Tomas-Callejas et al., 2012; Sant'Ana et al., 2011; Bennett et al., 2015). In addition, the absence of processing steps of these food products increases the potential of contamination reaching the consumer and disinfection cannot ensure the complete destruction of microbial contaminants on the surface of vegetables

(Holvoet et al., 2012; Gil et al., 2015; Mahajan et al., 2014; WHOa, 2015). Besides, numerous studies have been performed to determine the occurrence and the potential growth of this microorganisms in different types of vegetables (Giusti et al., 2010; Gorski et al., 2011; Sant'Ana et al., 2011). It has been demonstrated that this pathogen can grow until 8 log CFU/g on vegetables (Veys et al., 2016). Thus, prevent these infections depends on actions taken to reduce food contamination by regulatory agencies, food industries, and consumers (WHOb, 2015).

The predictive microbiology can predict the response of the growth of the microorganism in relation to variations in factors such as temperature, storage conditions, humidity and pH. This tool is very useful to resolve doubts related to food contamination and has emerged as an essential element of food microbiology promoting the quality and safety of food, supporting risk analysis, evaluating the shelf life, developing new products and processes, combining actions on decision-making (Oliveira et al., 2013).

In this sense, the aim of this study was to evaluate *Salmonella* spp. growth on cooked carrots and raw cabbage exposed to different temperatures in order to assess information for the safe storage and distribution of these food.

2. Materials and Methods

2.1 Cooked carrots and raw cabbage

All vegetables were acquired from a supermarket in Porto Alegre city, Southern Brazil. About 600 g of carrots were cooked in boiling water for 20 minutes, until become soft. After cooking, carrots were cooled at room temperature until reach 30 °C, being peeled and cut. Cabbage outer leaves were removed and it was cut into thin strips using a sterile glass cutting board and knife. The cooked carrots and raw cabbage were placed inside identified sterile plastic bags containing 10g of each separately.

2.2 Strains

Six *Salmonella* strains were used to compose the pool: *Salmonella* Enteritidis SE86, *Salmonella* Typhimurium L12031, *Salmonella* Typhimurium 1T2, *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Newport and *Salmonella* Saint Paul. All the strains came from the culture collection of the Laboratory Food Microbiology and Food Control (ICTA/UFRGS).

2.3 Inoculum preparation

The *Salmonella* strains were grown separately in 5 mL of BHI (Merck, Darmstadt, Germany), at 37°C for 24h. The cultures were centrifuged separately, at 4 °C, for 10 min, at 2810 g. Supernatants were discharged and pellets were washed with 0.1 % peptone water and this procedure was repeated 3 times. After, cells were re-suspended with 0.1 % peptone water and all *Salmonella* strains were mixed in one pool, reaching final cell concentration of 10⁸ CFU/mL, confirmed by plating on Xylose Lysine Deoxycholate (XLD, HiMedia, Mumbai, India) and Plate Count Agar (PCA, Kasvi, Paraná, Brasil). Decimal serial dilutions were prepared using 0.1% peptone water reaching final concentrations of approximately 3 log CFU/g.

2.4 Sample preparation and inoculation

10 g - portions of cooked carrots and raw cabbage were artificially contaminated with *Salmonella* pool and packed inside sterile bags with final cells concentration of 3 log CFU/g. After that, the vegetables were homogenized inside bags for 60 s, using a stomacher (Stomacher 400 Circulator Seward, United Kingdom).

2.5 Storage conditions and enumeration of pathogens on cooked carrots and raw cabbage

Sample were stored at 7, 10, 20, 30, and 38 °C for different periods. These parameters were identified in previous studies (Alfama, submitted) and analysis were carried out according

to Elias, Noronha & Tondo (2018). At each time point, 10 g of sample were homogenized with 90 mL of 0.1% peptone water, followed by decimal dilution in 0.1% peptone water. Then, aliquots were plated onto PCA and XLD agar and incubation at 37°C for 24h. All the bacterial counts were carried out in triplicate. The experiments were repeated three times and the results were expressed as log CFU/g.

2.6 Modeling of pathogens growth on cooked carrots and raw cabbage

The predictive primary model described by Baranyi and Roberts (1994) was used in order to calculate the growth kinetic parameters of *Salmonella* on cooked carrots and raw cabbage. The growth curves for each temperature was built by fitting the experimental data to the Baranyi's DMFit version 2.1 Excel® (add-in www.ifr.ac.uk/safety/DMfit). The following parameters were obtained: 1) maximum growth rate (μ); 2) lag time (λ) and 3) maximum population density. The predictive secondary model was built using the square root model described by Ratkowsky et al. (1982), aiming to describe μ as a function of storage temperature.

2.7 Model evaluation

Measures of coefficient of determination (R^2) was used to evaluate the performance of the models built in this study. The R^2 was generally considered as an overall measure of the prediction calculated by developed model, and the closer to 1 the better the model performance (Wang et al., 2013). The Root Mean Square Error (RMSE) was used to indicate the best possibility fit between predictive and observed values and the closer to 0 the better model performance (Oh et al., 2012; Wang et al., 2013). In addition, ComBase Predictor was used for further comparison with data generated in this study. For the runs, pH 5.85 and a_w of 0.999 was chosen to cooked carrots, while pH 6.02 and a_w 0.999 was chosen to raw cabbage.

3 Results and Discussion

The growth curves of *Salmonella* spp. on cooked carrot exposed at 7, 10, 20, 30 and 38 °C are shown in Figure 1. The lag phase of *Salmonella* at 7 °C was approximately 440 h, while at 10 °C it 29 h, at 20 °C it was around 4 h, at 30 °C it was around 3 h and at 37 °C it was approximately 1 h.

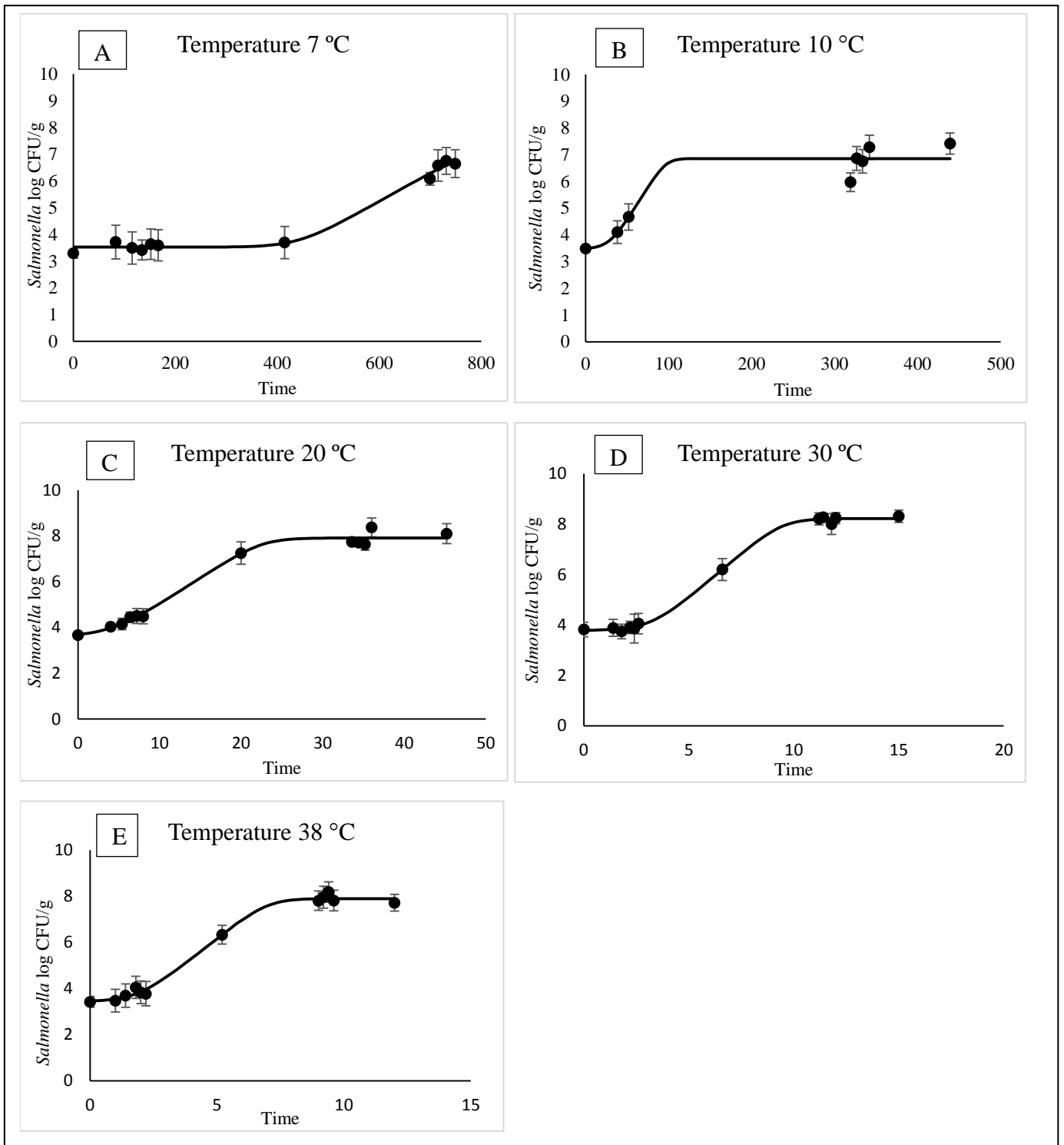


Figure 1: Growth of *Salmonella* spp. on cooked carrot stored at 7°C (A) 10°C (B) 20°C (C) 30°C (D) and 38 °C (E), fitting data to DMFit/ComBase. Each spot represents a mean of triplicate results.

Salmonella spp. growth curves started with an initial population of nearly 3.0 log CFU/g, reaching a final concentration ranged between 6.85 - 8.51 log CFU/g in all temperatures

evaluated. However, according to the software ComBase Predictor the final population in all temperatures was higher, around 8.48 log CFU/g (Table 1).

Table 1: Growth kinetic parameters of *Salmonella* pool on cooked carrot from this study and in ComBase Predictor Models at different temperatures.

Growth parameters	Model	Temperature (°C)				
		7	10	20	30	38
μ_{\max}	<i>Cooked Carrot Salmonella</i> pool	0.010±0.0010	0.049 ± 0.0755	0.231±0.0265	0.707±0.0934	0.869±0.0978
Λ		440.83±49.83	28.72 ±33.99	4.32±1.67	3.19±0.52	1.82±0.42
FP		7.32±0.29	6.854 ± 0.25	7.91±0.10	8.22±0.05	7.89±0.08
μ_{\max}	ComBase	0.013	0.03	0.222	0.67	0.837
Λ		149.57	67.40	7.15	2.31	1.86
FP		8.48	8.48	8.49	8.48	8.47

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

In the research of Sant'Ana (2013), *Salmonella* growth was inhibited on carrots stored 7 and 15 °C for 6 days. Kothe (2017) studied the predictive growth of *Staphylococcus aureus* on cooked broccoli, cucumber, watermelon and papaya, submitted at 20 °C and demonstrated growth after 24h, while *E. coli* required only 4 h to start the log phase on these same foods. Both *S. aureus* and *E. coli* multiplication started after 2 h on fruits and vegetables artificially contaminated and stored at 30 °C. Our results showed that *Salmonella* were able to grow on cooked carrot after 3 hours at 30 °C.

The R^2 for growth curves (primary models) of *Salmonella* pool on cooked carrot were higher than 0.98. This result indicate that a good fit occurred between the experimental data and the primary model, considering that the regression line approximated the real data.

Results of secondary model depicted in Table 2 were drawn based on the data (maximum growth rate) obtained in primary models. Secondary model allowed the prediction of the parameter (growth rate) described on the basis of the temperature variation. The coefficient of determination (R^2) of our results was 0.98, confirming the precision of our model.

Table 2: Secondary model represent by square root equation to predict growth rate as a function of temperature of *Salmonella* pool in cooked carrot.

	Secondary Model	R^2	RMSE
Cooked Carrot	$\sqrt{\mu}= 0.0277(T-2.364)$	0.98	0.012
ComBase	$\sqrt{\mu}= 0.0275(T-0.290)$	0.98	0.006

μ : growth rate (log CFU/g/h); R^2 : coefficient of determination; RMSE: root mean square error; T: temperature (°C).

The growth curves of *Salmonella* spp. on raw cabbage exposed to 20, 30 and 38 °C are shown in Figure 2. According to these results, *Salmonella* did not grow on raw cabbage stored at 7 and 10 °C for 29 days and 14 days, respectively. At 20 °C, *Salmonella* needed approximately 5 h to start stationary phase, at 30 °C it took around 8 h, while at 37 °C around 3 h. *Salmonella* spp. growth curves started with initial populations of nearly 3.0 log CFU/g, reaching final concentration of 6.38 log CFU/g and 7.44 log CFU/g at temperature of 20 and 38 °C, respectively. Meantime, according to the software ComBase Predictor the final population at all temperatures was higher, around 8.49 log CFU/g (Table 3).

Table 3: Growth kinetic parameters of *Salmonella* pool on raw cabbage and predicted by ComBase Predictor Models at different temperatures.

Growth parameters	Model	Temperature (°C)				
		7	10	20	30	38
μ_{max}	Raw Cabbage <i>Salmonella</i> pool	-	-	0.17 ± 0.02	1.36 ± 1.92	1.79 ± 20.41
λ		-	-	5.14 ± 2.27	8.39 ± 3.45	3.57 ± 18.58
FP		-	-	6.38 ± 0.09	7.03 ± 0.16	7.44 ± 0.17
μ_{max}	ComBase	0.014	0.031	0.22	0.693	0.86
λ		112.52	50.85	6.91	2.31	1.92
FP		8.49	8.49	8.49	8.48	8.49

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

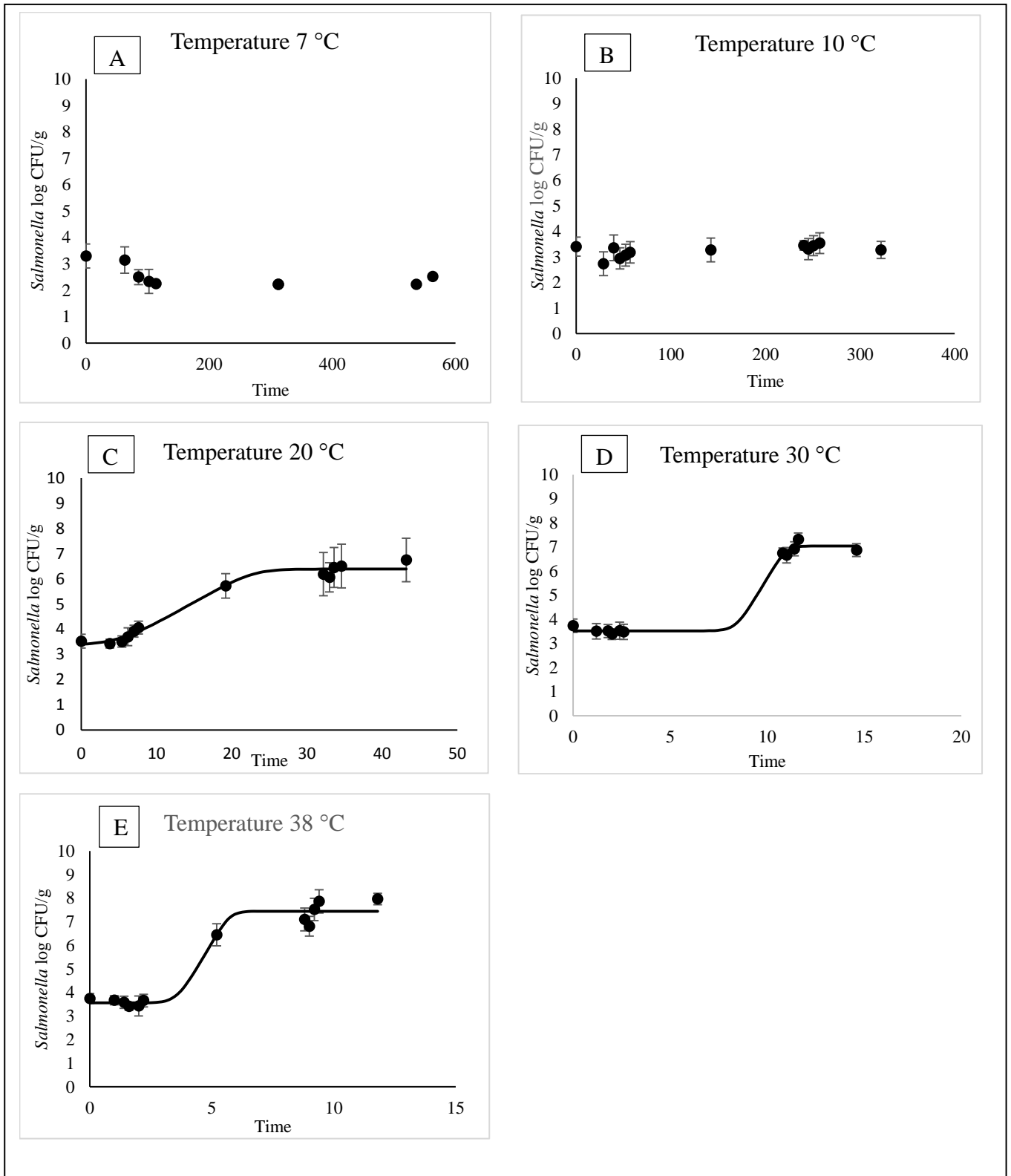


Figure 2: Growth of *Salmonella* spp. on raw cabbage stored at 20°C (C) 30°C (D) and 38 °C (E), fitting data to DMFit/ComBase. Each spot represents a mean of triplicate results. At 7°C (A) and 10°C (B) *Salmonella* pool did not grow.

In the work of Sant'Ana (2013) it was determined the growth potential of *Salmonella* in nine different types of RTE vegetables (escarole, collard green, spinach, watercress, arugula, grated carrot, green salad, and mix for yakisoba) stored at 7 °C and 15 °C. At 15 °C, after 6 days, *Salmonella* was able to grow on all vegetables, except on cabbage (Sant'Ana et al., 2013). These results corroborated with our study, which demonstrated that at 7 °C and 10 °C, there was no multiplication of *Salmonella* on cabbage. Kothe (2017) demonstrated the predictive growth of *S. aureus* on green cabbage and found that at 30 °C significant growth of *S. aureus* was observed after 6 h. The results of this research are similar to ours results, because at low temperatures below 20°C no significant growth of *Salmonella* was observed on raw cabbage.

In order to obtain the secondary model (Table 4), we used the data previously obtained in the primary model (maximum growth rate). Based on the temperature variation, it was possible to predict the parameters (growth rate) through the secondary model. The coefficient of determination (R^2) of our results was 0.92, confirming the accuracy of our model.

Table 4: Secondary model represent by square root equation to predict growth rate as a function of temperature of *Salmonella* pool on raw cabbage.

	Secondary Model	R^2	RMSE
Raw Cabbage	$\sqrt{\mu}= 0.0525(T-10.809)$	0.92	0.031
ComBase	$\sqrt{\mu}= 0.0279(T-2.896)$	0.98	0.003

μ : growth rate (log CFU/g/h); R^2 :coefficient of determination; RMSE: root mean square error; T:temperature (°C).

Since the primary model is used in predictive microbiology to describe the growth data under constant environmental conditions (Baranyi & Roberts, 1994), the secondary model describes the dependence of primary model parameters to environmental factors, such as temperature, water activity and pH (Ratkowsky et al., 1982). The constant improvement in temperature control and adoption of general sanitary-hygienic requirements are key factors for

the maintenance of food safety (Saccol et al., 2013). The data obtained in primary model were used to elaborate a secondary model (Table 2 and Table 4). The developed secondary model allowed the prediction of growth rate and lag time described on the basis of the temperature variation and to assess the growth of *Salmonella* on cooked carrot and on raw cabbage under different temperatures, ranging from 7 to 38 °C. The coefficient of determination (R^2) was close to 1 in both secondary models (0.98 for cooked carrot and 0.92 for raw cabbage), demonstrating precision of the model developed. Besides that, the low value of RMSE (0.012 and 0.031 for cooked carrot and cabbage, respectively) indicates that these models have a good fit. Based on these results, the models developed were considered adequate for modeling the growth of *Salmonella* on cooked carrot and on raw cabbage under various temperature scenarios.

The differences in the final concentrations of *Salmonella* spp. between cooked carrot and raw cabbage may have occurred due to nutrients available to the microorganisms or the presence of antimicrobial compounds in carrots and cabbage (Gogo et al., 2010; Noriega et al., 2010). Other fact influencing these differences is that raw cabbage did not support the growth of *Salmonella* at all storage conditions probably due to the low attachment strength of this bacterium to surface of cabbages (Sant'Ana et al., 2013). According to Patel and Sharma (2010), *Salmonella* presented the overall lower attachment strength on cabbage (0.12) when compared to Iceberg lettuce (0.23) and Romaine lettuce (0.34), after 24 h at 10 °C. In the study of Kothe (2017), heat treated broccoli was the vegetable presenting the highest growth potential, demonstrating to be a food which sustain to the growth of *S. aureus*. The author mentioned that heat treatment could inactivate antimicrobial compounds present on broccoli.

Despite of the increasing consumption and association of vegetables with foodborne disease outbreaks in recent years, few studies have focused on predicting the growth of pathogens on these foods (Sant'Ana et al., 2012; Tian et al., 2012; Puerta-Gomez et al., 2013; Danyluk et al., 2014; Park et al., 2014; Likotrafiti et al., 2014). Still, *Salmonella* spp. is among

the most common foodborne pathogens worldwide and this microorganism has been pointed out as the main etiological agent causing foodborne illnesses since 2000 in different countries (Braden & Tauxe, 2013; Brasil, 2018, WHO 2018). Thus, the primary and second model generated in the present study focusing on the *Salmonella* on cooked carrots and raw cabbage may be useful to producers, food handlers and even surveillance bodies in the process of decision making of distribution temperature regarding these food products in a fast and cost-effective alternative.

Inappropriate storage and distribution temperatures have been reported as important faults, contributing for the occurrence of foodborne outbreaks due to consumption of fresh products. Mainly at distribution step, food services have showed difficulties to follow the temperature preconized by some regulation bodies, for example $<5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Brasil, 2004; Frantz et al., 2008; Alves & Ueno, 2010). The results of this study show that *Salmonella* did not grow on cooked carrot and raw cabbage at temperatures below $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, suggesting that this could be a practicable limit of temperature for the distribution of refrigerated cooked carrot and raw cabbage. In addition, as expected, as higher the temperature as shorter was the lag phase. So, is suggested to control time of exposure at room temperature, aiming to avoid the multiplication of *Salmonella* on fresh and processed produce.

4 Conclusion

The developed model for *Salmonella* spp. growth can be used to predict the multiplication of this microorganism exposed to temperatures varying from $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ for cooked carrot and $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ for raw cabbage. Moreover, it can be concluded that the growth of *Salmonella* on these vegetables could be controlled by ensuring that these products are distributed in temperatures below $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, considering that distribution are frequently carried out in period shorter than 6 hours.

Acknowledgments

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

5 References

Alves, M. G., Ueno M. (2010). *Self-service* restaurants: food safety and sanitary quality. Rev. Nut., 23, 573-580

Anonymous (2008) Outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections associated with multiple raw produce items — United States, 2008. Morbidity and Mortality Weekly Report 57, 929–934

Anonymous (2010) Surveillance for foodborne disease outbreaks — United States, 2007. Morbidity and Mortality Weekly Report 59, 973–97

Baranyi J, Roberts TA (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int J. Food Microbiol. 23: 277-294

Bennett SD, Littrell KW, Hill TA, Mahovic M, Barton BC (2015). Multistate foodborne disease outbreaks associated with raw tomatoes, United States, 1990–2010: a recurring public health problem Epidemiol. Infect. 143: 1352–1359. DOI 10.1017/S0950268814002167

Braden, C.R.; Tauxe, R.V. Emerging Trends in Foodborne Diseases. Infect Dis Clin N Am 27 (2013) 517–533. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2013.06.001>

Brasil (2004). Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Accessed 12 April 2018

BRASIL (2018) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Dados Epidemiológicos – DTA período 2000 - 2017. Accessed 12 April 2018

Danyluk, M. D.; Friedrich, L. M.; Schaffner, D. W. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* on cut cantaloupe, honeydew and watermelon. *Food Microbiol.*, v. 38, p. 52-55, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.001>

EFSA. European Food Safety Authority, 2013. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). *EFSA Journal* 11, 3025-3163

Elias, SO, Noronha, TB, Tondo, EC (2018) Assessment of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 growth on lettuce exposed to isothermal and non-isothermal conditions. *Food Microbiol* 72: 206-213

Frantz, C. B., Bender, B., Oliveira, A. B. A., & Tondo, E. C. (2008). Avaliação de registros de processos de quinze unidades de alimentação e nutrição. *Alimentos e Nutrição*, 19(2), 167-175

Gil MI, Selma MV, Suslow T, Jacxsens L, Uyttendaele M, Allende A (2015) Pre - and Postharvest Preventive Measures and Intervention Strategies to Control Microbial Food Safety Hazards of Fresh Leafy Vegetables. *Crit Rev Food Sci Nut* 55:453–468. DOI 10.1080/10408398.2012.657808

Giusti, M., Aurigemma, C., Marinelli, L., Tufi, D., De Medici, D., Di Pasquale, S., De Vito, C., Boccia, A. (2010) The evaluation of the microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy. *J App Microbiol* 109, 996–1006. DOI 10.1111/j.1365-2672.2010.04727.x

Gogo, L.A., Shitandi, A.A., Lokuruka, M.N.I., Sang, W. (2010) Antimicrobial effect of juice extract from fermented cabbage against select food-borne bacterial pathogens. *J of App Sci Res* 6, 1807–1813

Gorski, L., Parker, C.T., Liang, A., Cooley, M.B., Jay-Russell, M.T., Gordus, A.G., Atwill, E.R., Madrell, R.E. (2011) Prevalence, distribution, and diversity of *Salmonella enterica* in a major produce region of California. *App Env Microbiol* 77, 2734–2748. DOI 10.1128/AEM.02321-10

Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., Garrett, E.H., Busta, F.F. (2003) Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehe Rev Food Sci Food Saf* 2, 78–141

Holvoet K, Jacxsens L, Sampers I, Uyttendaele M (2012). Insight into the prevalence and distribution of microbial contamination to evaluate water management in the fresh produce processing industry. *J Food Protect* 75: 671–681. DOI 10.4315/0362-028X.JFP-11-175

Kothe, C. I. 2017. Avaliação da multiplicação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em frutas e vegetais expostos a diferentes temperaturas e modelagem preditiva nos alimentos de maior risco. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017

Likotrafiti, E.; Smirniotis, P.; Nastou, A.; Rhoades, J. (2013) Effect of Relative Humidity and Storage Temperature on the Behavior of *Listeria monocytogenes* on Fresh Vegetables. *J Food Res*, 33, 4, 545-551

Little, C.L., Gillespie, I.A., 2008. Prepared salads and public health. *J App Microbiol* 105, 1729–1743. DOI <https://doi.org/10.1111/jfs.12087>

Maitland, J. E., Boyer, R. R., Eifert, J. D., & Williams, R. C. (2011). High hydrostatic pressure processing reduces *Salmonella enterica* serovars in diced and whole tomatoes. *Int J Food Microbiol*, 149(2), 113–117. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.024>

Mahajan, P. V., Caleb, O. J., Singh, Z., Watkins, C. B., & Geyer, M. (2014). Postharvest treatments of fresh produce. *Phil Trans of the Royal Soc of London*, 372, 1-19. DOI 10.1098/rsta.2013.0309

Noriega, E., Newman, J., Saggors, E., Robertson, J., Laca, A., Díaz, M., Brocklehurst, T.F., (2010) Antilisterial activity of carrots: effect of temperature and properties of different carrot fractions. *Food Res Int* 43, 2425–2431. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.012>

Oh, DH, Ding, T, Jin, YG (2012) A new secondary model developed for growth rate of *Escherichia coli* O157:H7 in broth. *Indian J Microbiol* 52:99-101. DOI 10.1007/s12088-011-0198-y]

Olaimat AN, Holley RA (2012) Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiol* 32: 1–19. DOI 10.1016/j.fm.2012.04.016

Oliveira, A. P., Rezende, C. S. M., Sola, M. C., Feistel, J. C., & Oliveira, J. J. (2013). *Microbiologia Preditiva*. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, 9(17), 1909-1927

Park, A., Hwang, I.-G., Lee, S.H., Cho, J.I., Lee, S., Lee, H., Yoon, Y. (2014) Predictive Models to Describe Behavior of *Staphylococcus aureus* in Sweet Pumpkin Salad Under Constant and Dynamic Temperature. *J of Food Safety*, 34, 257–262. DOI <https://doi.org/10.1111/jfs.12121>

PBH. Produce for Better Health Foundation. (2015). Study on America's Consumption. State of the Plate. Available: <<http://www.pbhfoundation.org>>. Accessed on 27 September 2018

Pollack, S. (2001) Consumer Demand for Fruit and Vegetables: The U.S. Example: Economic Research Service. Washington, DC, USA: United States Department of Agriculture

Puerta-Gomez, A. F. et al. (2013) Modeling the growth rates of *Escherichia coli* spp. and *Salmonella* Typhimurium LT2 in baby spinach leaves under slow cooling. *Food Cont*, 29, 11-17. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.070>

Ratkowsky DA, Olley J, Mcmeekin TA, Ball A. (1982) Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J Bacteriol.*, 149:1-5

Saccol, A. L., Setrafim, A. L., Hecktheuer, L. H. R., Medeiros, L. B., Spinelli, M. G. N., Abreu, E. S., Chaud, D. M. A. (2013). Hygiene and sanitary conditions in self-service restaurants in São Paulo, Brazil. *Food Cont*, 33, 301-305. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.030>

Sant'Ana A.S., Landgraf M, Destro MT, Franco BDGM (2011) Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in Sao Paulo, Brazil. *Food Microbiol.* 28, 1235–1237. DOI 10.1016/j.fm.2011.04.002

Sant'Ana, A. S., Barbosa, M. S., Destro, M. T. Landgraf, M., Franco, B. D. G. M. (2012). Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International J Food Microbiol* 157, 52–58. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.011>

Sant'Ana, A. S., Landgraf, M., Destro, M. T., Franco, B. D. (2013). Growth Potential of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce and collard greens packaged under modified atmosphere and in perforated film. *J Food Protecti*, 76(5), 888-891. DOI 10.4315/0362-028X.JFP-12-479

Sivapalasingam, S., Friedman, C.R., Cohen, L., Tauxe, R.V., (2004) Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J Food Protect* 67, 2342–2353

Slavin, J. L.; Lloyd, B. (2012). Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Adv Nut*, 3, 506-516. DOI 10.3945/an.112.002154]

Tian J. et al. (2012) Survival and Growth of Foodborne Pathogens in Minimally Processed Vegetables at 4 and 15 °C. *J. Food Science*, v. 71, n. 1, p. 48-50. DOI 10.1111/j.1750-3841.2011.02457. x

Tomas-Callejas A, López-Gálvez F, Sbodio A, Artes F, Artes-Hernandez F, Suslow TV (2012) Chlorine dioxide and chlorine effectiveness to prevent *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* cross-contamination on fresh-cut Red Chard. *Food Cont*, 23, 325–332. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.022>

Veys, O., Elias, S. O., Sampers, I., Tondo, E. C. 2016. Modelling the growth of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157 on lettuce. *Procedia Food Science* 7 168 – 172. DOI <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2016.10.003>

Wang HY, Wen CF, Chiu YH, Lee IN, Kao HY. *Leuconostoc Mesenteroides* Growth in Food Products: Prediction and Sensitivity Analysis by Adaptive-Network-Based Fuzzy Inference Systems. *PLoS ONE*, 2013, 8, 1-16. doi:10.1371/journal.pone.0064995

WHO. 2015a. Food safety Fact sheet N°399. Available: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>> Accessed on: 09 august 2018

WHO.2015b. Estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Available: <http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en> Accessed on 27 September 2018

WHO 2018. Food safety. Available: < <http://www.who.int/news room/factsheets/detail/food-safety>> Accessed on: 09 august 2018

6 DISCUSSÃO GERAL

O setor de serviços, principalmente de alimentação, tem demonstrado um crescimento gradativo, nos últimos nove anos, no Brasil. Isso se deve a procura crescente da alimentação fora do domicílio, principalmente em ambientes de trabalho. Segundo a ABERC, em 2018, esse setor movimentou cerca de 33 bilhões de reais entre refeições coletivas e refeições convênio (ABERC, 2018). Tal demanda impacta diretamente na produção de alimentos em grande escala, gerando forte preocupação com a qualidade e com a segurança desses alimentos e como eles são preparados e servidos nesses locais. Por esses motivos, acompanhar as etapas de recebimento, armazenamento, pré-preparo, preparo e distribuição desses alimentos é importante, tendo em vista que, em todas as cozinhas industriais, o uso de equipamentos e utensílios é constante, e a higienização inadequada pode ocasionar contaminação cruzada e o volume de preparações é expressivo.

No Brasil, dados divulgados pelo Ministério da Saúde referente aos locais onde mais ocorreram surtos alimentares, pode se destacar os restaurantes/padarias e similares, instituições e ainda as residências. Esses resultados demonstram que as empresas do setor de alimentação apresentam dificuldades em manter o controle efetivo em todas as etapas de produção dos alimentos preparados e distribuídos para a população consumidora.

Em vista disso, para a realização desse estudo, fizemos uma parceria com uma grande empresa do setor de alimentação. A primeira etapa da presente Tese só foi possível devido a uma parceria do laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos – ICTA/UFRGS com uma forte empresa multinacional do setor de alimentação coletiva, a qual disponibilizou as planilhas de controle de temperaturas de distribuição de alimentos das preparações frias e quentes de 377 restaurantes, distribuídos nas 5 macrorregiões do Brasil. A escolha de restaurantes industriais ao invés de restaurantes comerciais para realizar esse estudo deveu-se

ao fato de que grande parte desses estabelecimentos apresentam planilhas de controle de temperaturas, assim como a presença de nutricionista, o que não ocorre com frequência nos restaurantes comerciais. Além disso, restaurantes industriais recebem com mais frequência auditorias internas e oferecem treinamentos para suas equipes, tornando mais possível a implementação de medidas de controle. Ao todo foram recebidas cerca de 10.000 planilhas de controle de temperatura de alimentos, na distribuição, as quais foram oriundas de restaurantes industriais que serviam entre 500 e 1500 refeições por almoço. Os meses escolhidos foram março (mês quente) e julho (mês frio) e foram selecionadas preparações frias e quentes que foram comparadas as temperaturas dessas preparações na distribuição, com a temperatura externa. Do total de 339.548 registros avaliados, foram analisados 16.754 dados referentes a preparações frias e dessas preparações, os vegetais crus e vegetais cozidos mais distribuídos foram selecionados. Além dos vegetais, o pudim, uma sobremesa que passa pelo processo de resfriamento, também foi selecionada. A alface foi a salada mais servida (5.294), seguida por beterraba (2.823), cenoura (2.577), repolho (2.029), grão-de-bico (1.201), couve-flor (128) e, por fim, o pudim (2.702). Foi observado que a temperatura dos alimentos frios na distribuição variou entre 1 e 38,3°C com média 10,8°C. Os alimentos cozidos e posteriormente resfriados foram as preparações que apresentaram temperaturas mais elevadas, o que demonstrou a dificuldade de manter essas preparações em temperaturas inferiores a 5°C, preconizadas pela legislação brasileira (RDC 216/2004). Essa dificuldade já foi relatada por outros autores em seus estudos (FRANTZ et al., 2008; ALVES & UENO, 2010).

Dos alimentos quentes, foram analisados 34.060 dados e as preparações mais servidas foram arroz (10.953), feijão (10.516), frango grelhado (2.438), massa (2.009), bife de gado (1787); carne suína (1.453), cubos de carne de gado com molho (1.089), carne de gado assada (918), cubos de frango com molho (612), carne moída (609), almôndegas (447), frango gratinado (332), frango à milanesa (198) e frango frito (96). As temperaturas variam entre 29,5

e 105°C com média de 78,3°C. Conforme os resultados demonstrados, a média da temperatura das preparações quentes na distribuição estava de acordo com a legislação brasileira (<60°C). No entanto, Momesso et al. (2005) encontraram apenas 20% das refeições quentes com temperaturas acima de 60°C, em restaurantes *self service* na cidade de São Paulo, enquanto que no nosso estudo 99,5 % das preparações quentes estavam conforme a legislação brasileira vigente.

O Brasil é um país tropical com variações climáticas de norte a sul e além disso, os restaurantes não possuem ambientes climatizados. Os resultados dessa Tese demonstraram que a macrorregião Nordeste registrou temperaturas médias mais elevadas no mês quente (março) 27,9°C e a macrorregião Sul registrou temperaturas médias mais baixas, 15,1°C. Já, a macrorregião Sudeste que apresentou temperaturas médias de 25,1°C no verão e 20,2°C no inverno, também apresentou temperatura média superior dos alimentos expostos na distribuição no mês de verão quando comparado com a distribuição dos alimentos no mês de inverno. Esse resultado sugere que temperaturas externas elevadas, podem dificultar o controle das temperaturas de distribuição das preparações frias nos restaurantes industriais. Nas outras macrorregiões não foi encontrado diferença significativa com relação aos alimentos produzidos e a temperatura externa.

Os registros das temperaturas das preparações quentes e frias foram avaliados no programa @Risk e os melhores ajustes de distribuição, com RMSE próximos a zero foram observados como Beta General (refeições frias) e Triangular (refeições quentes). O tempo de distribuição de 6h foi atribuído como pior cenário, uma vez que esse é o período máximo permitido pela legislação brasileira para a distribuição dos alimentos. Para esse tempo, a distribuição Pert foi a mais adequada para descrever o tempo de duração dos alimentos na distribuição, neste caso contemplando o tempo mínimo, mais provável e o tempo máximo de distribuição (0h, 2h e 6h). Estes resultados corroboram com estudos de Azevedo et al. (2005) e

Roccatto, Uyttendaele & Membré (2017). Esses resultados podem dar subsídios importantes a respeito da probabilidade de multiplicação de micro-organismos nos alimentos. (Adams & Moss, 2008; Membré & Valdramidis, 2016; Membré & Guillou, 2016,).

Nos cenários criados para avaliar a multiplicação de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* nos alimentos selecionados, as refeições quentes não foram testadas porque apenas 0,5 % delas não estavam adequadas, o restante, ou seja, 99,5 % estavam acima de 60°C, temperatura que impede a multiplicação ou sobrevivência da maioria dos patógenos alimentares.

Para prever a multiplicação dos patógenos, foi utilizado o software *ComBase Predictor*, o qual possibilita analisar temperaturas entre 7 e 40°C para *Salmonella* spp. e entre 1 e 40°C para *L. monocytogenes*, juntamente com o pH e a_w dessas preparações.

Com base nos resultados descritos nos modelos previstos pelo *ComBase Predictor*, a *Salmonella* spp. não se multiplicou nos alimentos expostos a 7°C, durante o período de 6h. No entanto, Lanciotti et al. (2001) relataram que *Salmonella* Enteritidis multiplicou a 4,69°C. Já na temperatura de 36,5 °C, todas as preparações frias apresentaram multiplicação, o que diminuiu ligeiramente a 40°C. Para os resultados do cenário real (temperaturas registradas neste estudo), a multiplicação da *Salmonella* spp. variou entre 0,02 e 1,06 log UFC/g nas temperaturas entre 1 e 38,3°C.

De acordo com o *ComBase Predictor*, para as temperaturas de 10, 15 e 21°C, no período de 6h, a multiplicação bacteriana apresentou resultados entre 0 e 0,43 log UFC/g, considerado insignificante quando comparado com δ , que é de 0,5 log UFC/g. Logo, mesmo no pior cenário (21°C/6h), o valor predito (δ) foi menor que 0,5 log UFC/g. Esses resultados corroboram com os encontrados por Sant'Ana et al. (2012), que utilizaram o potencial de crescimento (δ) para avaliar a multiplicação de *Salmonella* spp. em salada verde e espinafre (0,46 e 0,23 log UFC/g, respectivamente).

L. monocytogenes é um patógeno de origem alimentar de preocupação mundial, devido à sua alta taxa de mortalidade e possibilidade de multiplicação a baixas temperaturas (Azevedo et al., 2005; Forsythe, 2013; Duret et al., 2014). No cenário real deste estudo, a multiplicação da *L. monocytogenes* foi de 0,05 e 2,09 log UFC/g. Já nos modelos preditivos, a bactéria não se multiplicou nos alimentos nas temperaturas entre 1 e 5°C e apresentou multiplicação entre 0,01 e 0,03 log UFC/g nas temperaturas entre 10 e 15°C, na temperatura de 21°C os valores permaneceram entre 0,07 e 0,19 log UFC/g todos testados no pior cenário de distribuição definido neste estudo (6h). Todos esses valores de multiplicação dos modelos preditivos foram considerados insignificantes quando comparados com potencial de crescimento (δ) de 0,5 log UFC/g. Já, na temperatura de 36,5°C, a multiplicação foi entre 0,53 e 1,48 log UFC/g, sendo que a 40°C a multiplicação diminuiu. Considerando o cenário real, todos os alimentos estudados apresentaram multiplicação acima de 0,5 log UFC/g, exceto a alface. Em um estudo realizado por Lokerse et al. (2016), foi observado que vários fatores podem interferir na multiplicação da *L. monocytogenes* em alimentos. Por exemplo, em repolho branco, a presença de bactérias lácticas teve efeito competitivo com as *L. monocytogenes*, podendo inibir a multiplicação desse micro-organismos. Noriega et al. (2010) também encontraram compostos inibitórios em cenouras. Fatores intrínsecos como pH e a_w podem impedir a multiplicação de *L. monocytogenes* em alimentos ($\text{pH} \leq 4,4$ e $a_w \leq 0,92$) (Forsythe, 2013; Álvarez-Ordóñez et al., 2015). Isso pode explicar a baixa taxa de multiplicação no repolho (0,01 log UFC/g na temperatura 21°C), segundo o modelo preditivo. De acordo com o mesmo modelo, na temperatura de 10°C, os alimentos frios não sustentaram multiplicação significativa para *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*. Isso está de acordo com a legislação de São Paulo (CVS 5/2013) que apresenta mais parâmetros de tempo e temperatura de distribuição de alimentos que a legislação federal. Segundo a CVS 5/2013, os alimentos expostos para o consumo imediato podem ser distribuídos a 10°C, por até 4h. Esses parâmetros associados aos resultados

da presente Tese indicam que a multiplicação de patógenos pode ser controlada por temperaturas abaixo de 10°C, sugerindo que a mesma poderia ser utilizada em distribuições de alimentos em nível nacional.

Considerando a quantidade de registros avaliados, este é provavelmente o maior levantamento de temperaturas de distribuição de alimentos já realizado no Brasil. Este estudo demonstrou a dificuldade que os serviços de alimentação enfrentam para seguir a temperatura preconizada pela legislação brasileira principalmente para os alimentos mantidos em temperaturas frias (BRASIL, 2004, RIO GRANDE DO SUL, 2009). Esse fato preocupa o setor de alimentação coletiva, visto que os alimentos devem ser distribuídos em temperaturas que garantem a inocuidade dos produtos servidos aos consumidores.

Para contemplar mais informações sobre o comportamento de micro-organismos, foi investigada a capacidade de multiplicação de *Salmonella* spp. em beterraba cozida e o uso de picadores tipo aranha no corte desse produto (Artigo 2). Esses picadores são frequentemente utilizados pelos manipuladores de alimentos nos serviços de alimentação e já foram identificados como fonte provável de contaminação de salmoneloses. Além disso, os dados registrados nas planilhas de controle, pelos restaurantes industriais, apresentaram temperaturas na distribuição de beterraba que variaram entre 1 e 37°C. Fato esse importante, pois demonstra as dificuldades enfrentadas pelo serviço de alimentação para manter esse alimento em temperatura abaixo de 5°C na distribuição.

Para conhecer as condições higiênico-sanitárias dos picadores utilizados pelos restaurantes industriais, foram avaliados 23 picadores tipo aranha utilizados por manipuladores de alimentos de 23 cozinhas industriais, quanto a possível contaminação natural com *Salmonella* spp. e micro-organismos indicadores. Essas cozinhas industriais serviam juntas, aproximadamente 18.500/dia, com produção média de 300 refeições diárias.

Os resultados das análises microbiológicas demonstraram que a média das contagens para micro-organismos mesófilos totais foram de 3,16 log UFC/cm². Dos 23 picadores analisados, apenas 8,7% apresentaram contagens superiores a 4 log UFC/cm² e 56,5% apresentaram menos de 1 log UFC/cm². As contagens de *Enterobacteriaceae* foram em média de 1,06 log UFC/cm², sendo que apenas um cortador apresentou contagem superior a 4 log UFC/cm² e 39,1% dos picadores analisados não apresentaram *Enterobacteriaceae*. Esses resultados corroboram com os encontrados por Kochanski et al. (2009) e Coelho et al. (2010), quando analisaram picadores de vegetais. Isso pode ser explicado pela adesão nos equipamentos de uma microbiota diversificada, a qual pode incluir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ANDRADE, 2008).

Coliformes termotolerantes não foram encontrados nos picadores, no entanto, a presença de *Salmonella* spp. foi detectada em dois picadores. Essa foi uma situação preocupante, pois a presença de *Salmonella* spp. nos picadores pode ocasionar uma contaminação nos alimentos que forem cortados com este equipamento, tendo em vista que eles apresentam um *design* que dificulta a higienização adequada e ainda podem acumular resíduos e formar biofilmes (OLIVEIRA et al., 2007).

Em vista do resultado encontrado nos picadores analisados, quanto a presença de *Salmonella* spp., foi simulada a distribuição da prevalência de *Salmonella* spp. nos picadores, utilizando o programa @Risk. O resultado demonstrou, considerando as incertezas amostrais, uma média de 13% da distribuição de prevalência desse patógeno nestes equipamentos. Além disso, segundo as informações das empresas, o consumo diário aproximado de beterraba foi de 1.110 Kg e, considerando a prevalência mínima e máxima de *Salmonella* spp., simuladas pelo @Risk, e a quantidade de beterraba consumida diariamente nesses locais, em média, a contaminação de beterraba por *Salmonella* poderia chegar a 144 kg. Resultado preocupante, haja visto que os alimentos devem estar isentos desse patógeno.

Um exemplo de um surto de salmonelose relacionado a beterraba e ervilhas cozidas ocorrido no Rio Grande do Sul, na cidade de Camaquã, em 2005, foi descrito por Murmann, et al. (2008). Os autores relataram que a combinação de contaminação cruzada e armazenamento em temperatura inadequada pode explicar a contaminação por *Salmonella* spp. nesses alimentos. Nos dois surtos, produtos derivados de animais também foram envolvidos, o que evidenciou que o contato com alimentos crus derivados de animais com superfícies contaminadas na cozinha pode ter permitido a contaminação cruzada desses alimentos. Ainda, após a cocção esses alimentos ficaram expostos em temperaturas ambientes, o que permitiu a multiplicação de *Salmonella* spp. até atingir contagens elevadas antes do consumo.

Outros autores já relataram que a contaminação por *Salmonella* spp. pode ocorrer através do contato com alimentos contaminados (crus ou cozidos), por que muitas vezes, devido à pressa na preparação e para uma rápida distribuição dessas preparações, os manipuladores usam o mesmo equipamento para cortar alimentos de origem animal e vegetal, o que pode levar à contaminação cruzada (KOCHANOSKI, et al., 2009; IIBUCHI et. al., 2010). Segundo Oliveira et al. (2007), os picadores de legumes são um dos equipamentos mais utilizados nos serviços de alimentação e também um dos equipamentos mais difíceis de limpar, resultando em acúmulo de resíduos e formação de biofilmes.

É conhecida a dificuldade de realizar uma higienização eficaz nesse tipo de equipamento, haja visto que o *design* higiênico dificulta uma higienização eficaz. Os materiais mais utilizados na confecção de equipamentos para os serviços de alimentação, são provavelmente, aço inoxidável ou polietileno, ambos encontrados também nos picadores de legumes. Foi demonstrado que a *Salmonella* pode colonizar ambos os materiais e formar biofilmes (OLIVEIRA, BRUGNETRA & PICCOLI, 2010; TONDO et al., 2010).

Tendo em vista o consumo praticamente diário de beterraba cozida nos restaurantes industriais e comerciais, e o tipo de equipamento usado para picar esse vegetal, bem como a

dificuldade de higienização desse equipamento, foi considerado importante avaliar o comportamento da *Salmonella* presente nesse equipamento. Para tanto, foram utilizados modelos preditivos primários e secundários. Para construção do modelo primário, as curvas de multiplicação de *Salmonella* em beterraba cozidas expostas a 7, 10, 20, 30 e 38°C foram elaboradas a partir de experimentos realizados em laboratório. O tempo para atingir a fase estacionária nessas curvas variou de acordo com o tempo de armazenamento (Artigo 2, Figura 1). A concentração final das amostras contaminadas variou entre 8,08 e 8,75 log UFC/g. Valores de pH e a_w foram inseridos no *ComBase Predictor* para prever a multiplicação de *Salmonella* nas beterrabas. Segundo *ComBase*, a população final foi de 8,48 log UFC/g. Em todas as temperaturas testadas no laboratório, a fase lag na beterraba cozida foi menor do que testada no *ComBase* (Tabela 4). Este resultado pode ter ocorrido devido ao fato de os dados laboratoriais terem sido analisados em um alimento específico, a beterraba cozida, enquanto no programa a multiplicação considerada de *Salmonella* spp. pode ter sido feita em caldo de cultura. Outro fator observado, foi que quanto maior a temperatura, menor o tempo de fase lag, como já era esperado. O maior tempo de fase lag (h) foi observado nas temperaturas de 7 e 10 °C (117 e 30 horas, respectivamente). Este resultado demonstra que o alimento mantido em baixas temperaturas não possibilita a multiplicação da *Salmonella*. Veys et al. (2016) encontraram resultados semelhantes com amostras de alfaces contaminadas artificialmente e armazenadas em temperatura de 10°C, por 24 horas.

A partir dos dados obtidos no modelo primário, foi elaborado um modelo secundário, que permitiu a predição da taxa de multiplicação e do tempo de multiplicação, com variação da temperatura. Os modelos utilizados foram capazes de avaliar a multiplicação de *Salmonella* em beterraba cozida em temperaturas que variam entre 7 e 38°C. Esses resultados indicaram um bom ajuste entre os dados experimentais e o modelo secundário (Tabela 5), pois o coeficiente de determinação (R^2) foi próximo a 1, demonstrando a precisão do modelo. Além disso, o valor

reduzido de RMSE (0.005) indicou que este modelo teve um bom ajuste. Com base nesses resultados, o modelo foi considerado adequado para modelar a multiplicação de *Salmonella* em beterraba cozida, sob várias condições de temperatura. Os resultados demonstraram que se a beterraba cozida for distribuída em temperaturas de 10°C ou menos, por até seis horas, a multiplicação do patógeno pode ser controlada.

A conscientização do consumidor sobre a importância do consumo de produtos frescos tem aumentado nos últimos anos e isto se deve a busca de uma alimentação saudável e melhor qualidade de vida (POLLACK, 2001; SLAVIN & LLOYD, 2012; PBH, 2016). No Artigo 3 foram selecionadas mais duas preparações que frequentemente foram servidas pelos 377 restaurantes industriais analisados. A cenoura foi servida 2.577 vezes, e a temperatura de distribuição variou entre 1 e 37°C, enquanto o repolho cru foi servido 2.029 vezes, em temperaturas entre 1 e 38,3°C, ambas preparações apresentando temperatura máxima, na distribuição, acima da preconizada pela legislação brasileira.

Como já demonstrado, o controle das temperaturas dos alimentos frios na distribuição é um grande desafio para os serviços de alimentação. Deste modo, foi considerado importante a construção de modelos preditivos primários e secundários que permitissem avaliar o comportamento da *Salmonella* nestes alimentos. Seguindo na construção dos parâmetros de multiplicação, para o modelo primário, as curvas de multiplicação de *Salmonella* em cenoura cozida e repolho cru expostas a 7, 10, 20, 30 e 38°C, foram realizadas através de análises microbiológicas realizadas em laboratório. O tempo para atingir a fase estacionária nas curvas de crescimento isotérmicas variou de acordo com o tempo de armazenamento (7°C – 440h; 10°C – 28h; 20°C – 4h; 30°C – 3h e 38° - 1,8h). Os resultados demonstraram que a fase lag foi maior em temperaturas mais baixas e a taxa de multiplicação aumentou à medida que a temperatura aumentou para a cenoura cozida (Artigo 3, Figura 1). No entanto, no repolho cru exposto a temperaturas de 7 e 10°C não houve multiplicação de *Salmonella* spp. Mais uma vez,

as temperaturas de 10°C ou menos, demonstraram não sustentar a multiplicação de *Salmonella* spp. Outro fator que pode dificultar a contaminação e posterior multiplicação da *Samonella* spp. em repolho, foi demonstrado por Patel & Sharma (2010), os quais observaram que *Salmonella* não se adere sobre esse vegetal. Os resultados das análises microbiológicas realizadas no laboratório apresentaram fase lag de 5,1h e 3,5h para as temperaturas de 20 e 38°C, respectivamente. No entanto, para a temperatura de 30°C apresentou fase lag de 8,3h. Diferentemente dos resultados laboratoriais, as predições do *ComBase*, em temperaturas de 20, 30 e 38°C, apresentaram fases lag 6,9h; 2,3h; 1,9h, respectivamente, o que observou-se que quanto maior a temperatura menor foi o tempo de fase lag.

Uma pesquisa divulgada pela FDA (2015) relatou tempos de fase lag mais curtos para *Salmonella* em tomate romã e em tomate coração de boi, cortados e mantidos a 22,2°C. Patel & Sharma (2010) descreveram a baixa multiplicação de *Salmonella* em alface iceberg, em temperatura de 10°C. Elias et al. (2016) utilizaram temperaturas semelhantes em um estudo com *Salmonella* em maionese caseira que apresentou, na temperatura de 10°C, fase lag de 4,3horas e Veys et al. (2016) em amostras de alface, expostas à temperatura de 10°C, apresentou fase lag de 24,6 horas.

Quanto ao modelo secundário, o mesmo indicou um bom ajuste entre os dados experimentais (Tabela 2 e Tabela 4), demonstrando precisão no modelo. Por fim, o repolho cru não apresentou multiplicação de *Salmonella* spp. nas temperaturas de 7 e 10°C e nessas mesmas temperaturas as amostras de cenoura cozida foram as que apresentaram maior fase lag e menor multiplicação microbiana. Estes resultados sugerem que nessas temperaturas os alimentos poderiam permanecer na distribuição por um período de 6h, tempo máximo permitido pela legislação brasileira.

7 CONCLUSÃO

- ✓ As preparações frias mais servidas nos 377 restaurantes industriais avaliados foram alface, beterraba, cenoura, repolho, grão-de-bico, couve-flor e pudim. As preparações quentes servidas mais frequentemente foram arroz, feijão, frango grelhado, massa, bife de gado; carne suína, cubos de carne de gado com molho, carne de gado assada, cubos de frango com molho, carne moída, almôndegas, frango gratinado, frango à milanesa e frango frito.
- ✓ As temperaturas de distribuição das preparações frias variavam entre 1 e 38°C com média de 10,8°C. Mesmo estando fora dos padrões de temperatura preconizados pela legislação brasileira, não houve registro de surtos nesses locais. Pode-se ressaltar que o tempo de exposição desses alimentos foi curto, devido ao grande fluxo de clientes e a reposição desses alimentos na distribuição ser realizada várias vezes, diminuindo assim o risco de multiplicação de micro-organismos. Apenas 11,1% dos alimentos refrigerados estavam abaixo de 5°C, temperatura preconizada pela legislação brasileira vigente. Este resultado demonstra a dificuldade dos serviços de alimentação em manterem os alimentos na temperatura exigida pela Legislação Federal. Quanto às preparações quentes, 99,5% estavam de acordo com a legislação brasileira, o que demonstra que as temperaturas das preparações quentes são mais fáceis de controlar na distribuição.
- ✓ Modelos preditivos simulados no Programa *Combase Predictor* para *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* para avaliar a taxa de multiplicação de alimentos frios, no tempo máximo de exposição de seis horas, não demonstraram multiplicação significativa nas temperaturas abaixo de 10°C. Estas temperaturas poderiam ser sugeridas como seguras para distribuição de alimentos frios em períodos menores que seis horas nos restaurantes industriais.

- ✓ Resultados dos modelos preditivos primário e secundário demonstraram que beterraba cozida e cenoura cozida contaminados artificialmente com um *pool* de *Salmonella* spp. e expostas às temperaturas de 7 e 10°C apresentaram taxa de multiplicação insignificante e longa fase lag. O repolho cru também não apresentou multiplicação nas temperaturas de 7 e 10°C. Estes resultados indicam que os alimentos poderiam ser distribuídos em temperaturas abaixo 10°C, por até 6h.
- ✓ Os resultados indicaram um bom ajuste entre os dados experimentais e os modelos preditivos do *Combase*. Com base nesses resultados, os modelos foram considerados adequados para modelar a multiplicação de *Salmonella* spp. em beterraba cozida, cenoura cozida e repolho cru expostas a diferentes temperaturas.
- ✓ Por fim, os resultados da modelagem preditiva indicaram que a temperatura de 10°C poderia ser sugerida como segura para distribuição de beterraba e cenoura cozida e repolho cru nos serviços de alimentação por um período máximo de 6 horas. Esses dados experimentais podem oferecer base para novos procedimentos a serem adotados pelos gestores dos serviços de alimentação. Além disso, o controle do tempo de reposição dos alimentos na distribuição poderia ser uma alternativa para impedir a multiplicação microbiana em diferentes cenários de distribuição, quando o controle da temperatura não for possível.

8 REFERÊNCIAS

- ABERC. **Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas**, São Paulo. Brasil. 2018. Disponível em: <http://www.aberc.com.br/mercadoreal.asp>. Acesso em: 10 set. 2018.
- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. (2008). **Food microbiology**, (3th ed.). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- ANDRADE, N. J. (2008) **Higiene na Indústria de Alimentos**, Varela, São Paulo.
- ADZITEY F.; HUDA N. *Listeria monocytogenes* in foods: Incidences and possible control measures. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 2848-2855, 2010.
- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. The challenge of challenge testing to monitor *Listeria Monocytogenes* growth on ready-to-eat foods in Europe by following the European Commission (2014) Technical Guidance document. **Food Research International**, 75. p. 233-243, 2015.
- ALVES, M. G.; UENO, M. Restaurantes *self-service*: segurança e qualidade sanitária dos alimentos servidos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23 n. 4, jul./ago. 2010.
- AUTIO T. et al. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. **Appl. Environ. Microbiol.**, 65, p. 150-155, 1999.
- AUVOLAT A.; BESSE N. G. The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food. **Food Microbiology**, v-53, p.135 e 149, 2016.
- AZEVEDO I., et al. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. **Food Control**, 16, 121-124, 2005.
- BARANYI J.; ROBERTS T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal Food Microbiology**, 23: 277-294, 1994.
- BENNETT S. D., et al. Multistate foodborne disease outbreaks associated with raw tomatoes, United States, 1990-2010: a recurring public health problem. **Epidemiol. Infect.** 143: 1352-1359, 2015.
- BEZERRA, I. N. et al. Away-from-home eating: nutritional status and dietary intake among Brazilian adults. **Public Health Nutrition**, v. 18, n. 06, p. 1011-1017, 2015.
- BRADEN, C. R.; TAUXE, R. V. Emerging Trends in Foodborne Diseases. **Infect Dis Clin N Am** 27 p. 517-533, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 15 set. 2004, Seção 1, p. 25.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS**. Dados Surtos de DTA Brasil, de 2007 a 2017, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. Dados Surtos de DTA Brasil, de 2000 a 2017, 2018.**

CARRASCO, E.; MORALES-RUEDA, A.; GARCÍA-GIMENO, R. M. Cross contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 545–556, 2012.

CASARIN L.S. et al. Influence of free energy in the attachment of *Salmonella* enteritidis and *Listeria monocytogenes* on the stainless steels AISI 304 and AISI 316. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie*. **Food Science Technology**, v. 69, p. 131-138, 2016.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Seven Multistate Outbreaks of Human *Salmonella* Infections Linked to Live Poultry in Backyard Flocks**, 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/Salmonella/live-poultry-05-16/index.htm>> Acesso em: 10 ago. 2018.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Multistate Outbreak of *Salmonella* Urbana Infections Linked to Imported Maradol Papayas**, 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/urbana-09-17/index.html>. Acesso em: 15 nov. de 2018.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Outbreak of *Salmonella* Infections Linked to Ground Beef**, 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/newport-10-18/index.html>. Acesso em: 15 nov. 2018.

COELHO, A. I. M. et al. Contaminação microbiológica de ambientes e de superfícies em restaurantes comerciais. **Ciência Saúde Coletiva** 15:1597-1606, 2010.

CSPI. Center for Science in the Public Interest. **Outbreack Alert! 2001-2010. A Review of Foodborne Illness in America**, Mar, 2013. Disponível em: http://cspinet.org/new/pdf/outbreak_alert_2013_final.pdf. Acesso em 12 fev. 2018.

DURET, S., et al. Identification of significant parameters in food safety by global sensitivity analysis and accept/reject algorithm: application to the ham cold chain. **International Journal of Food Microbiology**, 180, 39-48, 2014.

ELIAS et al. Modeling Growth Kinetic Parameters of *Salmonella* Enteritidis SE86 on Homemade Mayonnaise Under Isothermal and Nonisothermal Conditions. **Foodborne Path Dis**, 13:472-467, 2016.

EFSA. European Food Safety Authority. **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009**. EFSA, J. 9: 2090, 2014.

EFSA. European Food Safety Authority. ***Listeria monocytogenes*: update on foodborne outbreak**. 2018. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180703>. Acesso em: 15 nov. 2018.

FARBER J. M., PETERKIN P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 476-511, 1991.

FDA. Food and Drug Administration. **Program information manual retail food protection—storage and handling of tomatoes, 2015**. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/IndustryandRegulatoryAssistanceandTrainingResources/ucm113843.htm>. Acesso em: 8 jan. 2018.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Artmed, 2013. 607 p.

FRANTZ C. B. et al. Avaliação de Registros de Processos de Quinze Unidades de Alimentação e Nutrição. **Alim. Nutr.** Araraquara, v. 19, n. 2, p. 167-175, abr./jun. 2008.

GIL M.I. et al. Pre - and Postharvest Preventive Measures and Intervention Strategies to Control Microbial Food Safety Hazards of Fresh Leafy Vegetables. **Crit Rev Food Sci Nut**, 55:453–468, 2015.

HOLVOET et al. Insight into the prevalence and distribution of microbial contamination to evaluate water management in the fresh produce processing industry. **J Food Protect**, 75: 671-681, 2012.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão Pesq. anual Serv., Rio de Janeiro, v. 17, p. 1-4, 2015. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/150/pas_2015_v17_informativo.pdf. Acesso em: 01 dez. 2017.

IIBUCHI R. et al. Survival of *Salmonella* on a polypropylene surface under dry conditions in relation to biofilm-formation capability. **J. Food Prot.** 73 (8): 1506-10. Aug. 2010.

KAJAK, K. ç; KRAJEWSKA, D. K. Construction of predictive models of growth of microorganisms in salted and cured meat products. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 7, p. 152-159, 2006.

KESKINEN, L. A.; TODD. E. C. D.; RYSER, E. T. Impact of bacterial stress and biofilm-forming ability on transfer of surface-dried *Listeria monocytogenes* during slicing of delicatessen meats. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127 - 3. p. 298-304, 2008.

KOCHANSKI S. et al. Avaliação das condições microbiológicas de uma unidade de alimentação e nutrição. **Alim. Nutr.**, Araraquara v. 20, n. 4, p. 663-668, out./dez. 2009.

LANCIOTTI et al. Growth/no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration. **Food Microbiology**, 18, 659–668, 2001.

LEAL, D. Crescimento da alimentação fora do domicílio. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 17 (1), p. 123-132, 2010.

LEFF, J. W.; FIERER, N. Bacterial Communities Associated with the Surfaces of Fresh Fruits and Vegetables. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. 1-9, 2013.

LEONG D.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; JORDAN, K. Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. **Front Microbiol.** 5: 436, 2014.

LIN C. M. et al. Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. **J Food Protect.** 69: 71–79, 2006.

LIU, H.; WAHL, T. I.; JR SEALE, J. L.; BAI, J. Household composition, income, and food-away-from-home expenditure in urban China. **Food Policy**, v. 51, p. 97–103, 2015.

LOKERSE et al. Growth capacity of *Listeria monocytogenes* in ingredients of ready-to eat salads. **Food Control**, 60, p. 338-345, 2016.

MAHAJAN et al. Postharvest treatments of fresh produce. Philosophical Transactions of the Royal Society. 2014. Disponível em: <http://rsta.royalsocietypublishing.org/content/372/2017/20130309.short>. Acesso em: 12 set. 2018.

MARKS, B. P. Status of Microbial Modeling in Food Process Models. Comprehensive Reviews. **Food Science and Food Safety**, v. 7, p. 137-143, 2008.

MARINHO C. B.; SOUZA C. S.; RAMOS S. A. Avaliação do binômio tempo-temperatura de refeições transportadas. **Rev e-scientia**. v. 2 (1): 1-11, 2009.

McDONALD, K.; SUN, D.W. Predictive food microbiology for the meat industry: A review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 52, p. 1-27, 1999.

McMEEKIN, T. A., OLLEY, J.; RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: Towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 395- 407, 2002.

MEMBRÉ, J. M.; GUILLOU, S. Latest developments in foodborne pathogen risk assessment. **Current Opinion in Food Science**, 8, 120–126, 2016.

MEMBRÉ, J. M.; VALDRAMIDIS, V. Modeling in food microbiology. From predictive microbiology to exposure assessment. UK: **ISTE Press Ltd and Elsevier Ltd**, 2016.

MILAN C. et al. Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 67 n.2, Belo Horizonte, mar./abr. 2015.

MILLER, F. A. et al. Boletim de Biotecnologia. **A Microbiologia Preditiva como Instrumento da Garantia da Segurança de Produtos Alimentares**. Órgão Oficial da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia. SPBT. n. 78. Ed. Trimestral. Escola Superior de Biotecnologia. Universidade Católica Portuguesa. Set. 2004.

MOMESSO, A. P.; MATTÉ, M. H.; GERMANO, P. M. L. Avaliação das condições higiênico-sanitárias, por quilo, do município de São Paulo, durante o período de distribuição de refeições. **Hig. Aliment.** 19 (136): 81-9, 2005.

MONTEIRO, M. A. M. et al. Controle das temperaturas de armazenamento e de distribuição de alimentos em restaurantes comerciais de uma instituição pública de ensino. **Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 9 (1); 99 -106, 2014.

MÜRMAN, L. et al. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39: 529-534, 2008.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 41-51, 2000.

NORIEGA et al. Antilisterial activity of carrots: effect of temperature and properties of different carrot fractions. **Food Research International**, 43, p. 2425-2431, 2010.

OH, D. H.; DING, T.; JIN, Y. G. A new secondary model developed for growth rate of *Escherichia coli* O157:H7 in broth. **Indian J Microbiol**, 52: p. 99-101, 2012.

OLAIMAT A. N., HOLLEY R. A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. **Food Microbiol**, 32: p. 1-19, 2012.

OLIVEIRA, K. et al. Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to Stainless Steel Surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38 p. 318-323, 2007.

OLIVEIRA, A. P. et al. Microbiologia Preditiva. Enciclopédia Biosfera, **Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v. 9, n. 17; p. 1909, 2013.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, São Paulo, 69 (3), p. 277-84, 2010.

ONU. Organização das Nações Unidas. **Perspectiva Global Reportagens Humanas**. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2018/01/1606522>. Acesso em: 29 set 2018.

ONUBR. Organização das Nações Unidas no Brasil. **África do Sul enfrenta 'maior surto de listeriose do mundo'**. 2018. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/africa-do-sul-enfrenta-maior-surto-de-listeriose-do-mundo-oms-oferece-apoio/> Acesso em: 18 out 2018.

PATEL, J.; SHARMA, M. Differences in attachment of *Salmonella* enterica serovars to cabbage and lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology**, 139, p. 41-47, 2010.

PAPADOPOULOU O. S. et al. Transfer of foodborne pathogenic bacteria to non-inoculated beef fillets through meat mincing machine. **Meat Sci**, 90, p. 865-869, 2012.

PENEDO, A. O. et al. Avaliação das temperaturas dos alimentos durante o preparo e distribuição em restaurantes comerciais de Belo Horizonte - MG. **Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v.10 (2), p. 429-440, 2015.

POLLACK, S. **Consumer Demand for Fruit and Vegetables: The U.S. Example: Economic Research Service**. Washington, DC, USA: United States Department of Agriculture, 2001.

PBH. Produce for Better Health Foundation. **Study on America's Consumption**. State of the Plate. 2016. Disponível em: <<http://www.pbhfoundation.org>>. Acesso em: 25 ago. 2018.

PROENÇA, R. **Aspectos organizacionais e inovação tecnológica em processos de transferência de tecnologia**: uma abordagem antropotecnológica no setor de Alimentação Coletiva. Tese (Doutorado em Engenharia). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.

RAMASWAMY V. et al. *Listeria* review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology and Immunology Infection**, v. 40, p. 4-13, 2007.

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

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. **Portaria Estadual 78, de 30 de janeiro de 2009**. Estabelece os procedimentos de Boas Práticas para Serviços de Alimentação, a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado.

ROCCATO, A.; UYTENDAELE, M.; MEMBRÉ, J. M. Analysis of domestic refrigerator temperatures and home storage time distributions for shelf-life studies and food safety risk assessment. **Food Research International**, 96, 171-181, 2017.

RUBINO, S.; CAPPUCINELLI P.; KELVIN, D. J. *Escherichia coli* (STEC) serotype O104 outbreak causing haemolytic syndrome (HUS) in Germany and France. **J Infect Dev Ctries**, 5(6): p. 437-440, 2011.

SANT'ANA et al. Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in Sao Paulo, Brazil. **Food Microbiol**, v. 28: p. 1235-1237, 2011.

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

SÃO PAULO. Secretaria da Saúde. Centro de Vigilância Sanitária. **Portaria CVS 5, de 09 de abril de 2013**. Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação.

SCALLAN E. et al. Foodborne illness acquired in the United States major pathogens. **Emerg. Infect. Dis.** 17 (1), p. 7 e 15, 2011.

SLEATOR R. D.; WATSON D.; HILL C.; GAHAN C. G. M. The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract. **Microbiology**, v.155, (8), p.2463-75, 2009.

SLAVIN, J. L.; LLOYD, B. Health Benefits of Fruits and Vegetables. **Advances in Nutrition**, v. 3, p. 506-516, 2012.

STEPHAN R. et al. Foodborne transmission of *Listeria monocytogenes* via ready-to-eat salad: a nationwide outbreak in Switzerland, 2013-2014. **Food Control**, 57, 14e17, 2015.

- SUIHKO et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from the meat, poultry and seafood industries by automated ribotyping. **Int J Food Microbiol**, Jan 30; 72(1-2):p. 137-46, 2002.
- SWAMINATHAN B.; GERNER-SMIDT P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, 2007.
- Tomas-Callejas et al. Chlorine dioxide and chlorine effectiveness to prevent *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* cross-contamination on fresh-cut Red Chard. **Food Control**, v. 23, p. 325–332, 2012.
- TONDO et al. Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. **Braz. J. Microbiol** São Paulo, . v. 41, n.4 out./dez. 2010.
- TONDO, E. C.; RITTER, A. C. *Salmonella* and Salmonellosis in Southern Brazil: a review of the last decade. In: Monte AS, De Santos PE, editors. *Salmonella: Classification, Genetics and Disease Outbreaks*. New York: **Nova Publishers**, p. 175-191, 2012.
- TONDO, E. C.; RITTER, A. C.; CASARIN, L. S. Involvement Foodborne Outbreaks, Risk Factors and Options to Control *Salmonella* Enteritidis SE86: An Important Food Pathogens in Southern Brazil. In Hackett CB, editor. *Salmonella*. New York: **Nova Publishers**, p. 175-191, 2015.
- TONDO, E.; BARTZ, S. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2014, 263 p.
- VEYS, O. et al. Modelling the growth of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157 on lettuce. **Procedia Food Sci**, v. 7: p. 168-172, 2016.
- VON LAER et al. Characterization of *listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in pelotas-rs by pfgc. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 574-582, 2009.
- WADAMORI Y.; GOONERATNE R.; HUSSAIN M A. Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce. **J Sci Food Agric**, v. 97, p. 1396–1403, 2017.
- WANG et al. *Leuconostoc Mesenteroides* Growth in Food Products: Prediction and Sensitivity Analysis by Adaptive-Network-Based Fuzzy Inference Systems. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1-16, 2013.
- WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. A classification of models in predictive microbiology. **Food Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 175-177, 1993.
- WHITING, R. C. Microbial modelling in foods. Critical Reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 467-494, 1995.
- WHO. World Health Organization. **Five Keys to Safer Food**. 2006. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/en/>. Acesso em: 11 set. 2018.

WHO. **Food safety Fact sheet N° 139**. 2013. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>> Acesso em: 09 ago. 2018.

WHO. **Food safety Fact sheet N° 399**. 2015. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>> Acesso em: 09 ago. 2018.

WHO. **Food safety**. 2018. Disponível em <
<http://www.who.int/news room/factsheets/detail/food-safety>> Acesso em: 09 de agosto de 2018.

ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Spices and herbs as source of *Salmonella*-related foodborne diseases. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 765-769, 2012.